

**Einfluß von Phenobarbital
auf die induzierte Zellproliferation
während der Lebercarcinogenese**

Hubert Wagner

München 1988

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Vorstand: Professor Dr. M. Eder

Einfluß von Phenobarbital auf die induzierte
Zellproliferation während der Lebercarcinogenese

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hubert Wagner
aus
München
1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	:	Prof. Dr.med. Hartmut Rabes
Mitberichterstatter:		Prof. Dr.med. Max Eder Prof. Dr.med. Wolfgang Forth
Dekan	:	Prof. Dr.med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 14. 04. 1988

Herrn Prof. Rabes gebührt mein herzlicher Dank für die Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung bei dieser Arbeit.

Gedankt sei den Mitarbeitern von Prof. Rabes, die durch ihre Fachkenntnisse und zahlreiche anregende Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Besonders seien genannt: Frau Kerler, Frau Metzger, Frau Sickert, Frau Wendt, Frau Dr. Schuster und Frau Rode.

Frau Döhle und Herrn Hampe danke ich für die phototechnische Hilfe.

Herrn R. Galm, mit dem im Rahmen seiner Dissertation ein Teil der Arbeit gemeinschaftlich durchgeführt wurde, danke ich für die zahlreichen kritischen Diskussionen und die Mithilfe bei der experimentellen Durchführung.

Die Untersuchungen wurden mit der finanziellen Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Dr. Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung durchgeführt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Abkürzungen

ATPase	:	Adenosintriphosphatase
DENA	:	Diethylnitrosamin
EAB	:	Enzymaberrationsbezirk
GGT	:	Gammaglutamyltranspeptidase
G-1-Phase	:	Präsynthetische Phase
G-2-Phase	:	Prämitotische Phase
HU	:	Hydroxyharnstoff
i. p.	:	intraperitoneal
KG	:	Körpergewicht
LD 50	:	Letale Dosis 50
Lob dext (Ld):	:	Lobus dexter
Lob caud (Lc):	:	Lobus caudatus
MI	:	Markierungsindex
M-Phase	:	Mitosephase
PB	:	Phenobarbital
PH	:	Partielle Hepatektomie
S-Phase	:	DNA-Synthesephase
³ H-TdR	:	Radioaktiv markiertes Thymidin
tc	:	Dauer des Zellzyklus
Tg	:	Tage
ts	:	Dauer der DNA-Synthesephase

Inhaltsverzeichnis

Seite

A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	13
1.	Versuchstiere	13
2.	Gewichtskontrolle der Versuchstiere	13
3.	Einteilung in verschiedene Versuchsgruppen	13
4.	Carcinogen und seine Applikation	16
5.	Dauerbehandlung mit Phenobarbital als Promotor ..	16
6.	Partielle Hepatektomie	16
7.	Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion	18
8.	³ H-Thymidin-Pulsmarkierung	18
9.	³ H-Thymidin-Dauermarkierung	19
10.	Herstellung der enzymhistochemischen Präparate ..	21
10.1	ATPase-Präparate	22
10.2	GGT-Präparate	22
11.	Autoradiographie	27
12.	Auswertung: Bestimmung des Markierungsindex, der Enzymaberrationsbezirke und des autoradio- graphischen Backgrounds	27
13.	Statistische Auswertung	30
C.	Ergebnisse	33
1.	³ H-Thymidin-Pulsmarkierung	33
1.1.	Tabellarische und graphische Zusammenfassung	33

1.2.	Erläuterung der Ergebnisse zur ³ H-TdR-Pulsmarkierung	51
1.2.1.	Markierungsindices im Normalgewebe und in Enzymaberrationsbezirken	51
1.2.2.	Flächenanteil der Enzymaberrationsbezirke an der Gesamtfläche	52
1.2.3.	Numerische Dichte der Enzymaberrationsbezirke ...	52
1.2.4.	Proliferationskinetik in Abhängigkeit von der Größe der Enzymaberrationsbezirke	53
2.	³ H-Thymidin-Dauermarkierung	58
2.1.	Tabellarische und graphische Zusammenfassung	58
2.2.	Erläuterungen der Ergebnisse zur ³ H-TdR-Dauermarkierung	69
2.2.1.	Wachstumsfraktion im Normalgewebe und in Enzymaberrationsbezirken	69
2.2.2.	Flächenanteil der Enzymaberrationsbezirke an der Gesamtfläche	69
2.2.3.	Numerische Dichte der Enzymaberrationsbezirke ...	70
3.	Veränderung des Körpergewichts DENA-behandelter und nicht DENA-behandelter Versuchstiere	70
D.	Diskussion der Ergebnisse	73
1.	Proliferationsverhalten der Hepatozyten im Normalgewebe und in Enzymaberrationsbezirken	74
2.	Bestimmung der relativen Anzahl und Größe der Enzymaberrationsbezirke	78

3.	Vergleichende Diskussion mit den Ergebnissen einer Versuchsgruppe ohne Phenobarbitalexposition (Galm, 1987)	83
E.	Zusammenfassung	96
F.	Literaturverzeichnis	101

A. Einleitung

Tumoren werden als Wachstumsprozesse mit autonomem Charakter definiert. Das eigengesetzliche, nicht der Kontrolle des Organismus unterliegende Wachstum unterscheidet sie vom regulierten Wachstum bei der Entwicklung, Regeneration und Hyperplasie. Diese veränderten Wachstumsformen maligner Tumoren zu erforschen, ist Ziel vieler wissenschaftlicher Arbeiten. Die Leber bietet als Modellsystem für die experimentelle Carcinogenese bei der Analyse abnormer Wachstumsvorgänge große Vorteile, da an diesem Organ umfassende Informationen über die Biochemie der Carcinogenese in verschiedenen Entwicklungsstadien einerseits (Farber, 1976, 1984) und der Physiologie der Regeneration andererseits (Bucher, 1967; Bucher und Malt, 1971; Becker, 1970, 1973; Grisham 1973) zur Verfügung stehen.

In der Carcinogenese liegt zwischen der Exposition gegenüber einem carcinogenen Agens und der Ausbildung eines klinisch manifesten malignen Tumors meist eine lange Zeitspanne. Rous und Mitarbeiter (Rous und Kidd, 1941; Friedwald und Rous, 1944) postulierten aufgrund experimenteller Ergebnisse einen 2-Schrittmechanismus in der Carcinogenese bei Hauttumoren. Sie nannten diese Schritte Initiation und Promotion. Nach Untersuchungen von Berenblum und Shubik (1947; 1949) bei der Hautcarcinogenese ist die Initiation Folge einer direkten Einwirkung eines Carcinogens auf eine Zielzelle und deren irreversible Veränderung. Die zweite Phase, die Promotionsphase, dauert länger und ist abhängig von der Anwesenheit eines Agens, welches selbst keine initiiierende Potenz besitzt, aber fähig ist, die Zeitspanne bis zum Auftreten eines Tumors zu verkürzen. Peraino et al. zeigten 1973, daß

auch die Hepatocarcinogenese in verschiedene Phasen eingeteilt werden kann.

Während der Initiation kommt es zu einer irreversiblen Schädigung der Zelle auf molekularer Ebene (Pitot und Sirica, 1980). Die Schädigung durch ein inkomplettes Carcinogen, eine Substanz mit alleiniger initiiender Wirkung, führt jedoch ohne Promotor nicht zur Ausbildung eines malignen Tumors. Die Initiation ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem von der Position der Zelle während des Zellzyklus bei der Exposition mit einem initiienden Faktor (Craddock und Frei, 1974; Fridman-Manduzio et al., 1977; Hartmann und Rabes, 1982; Müller und Rabes, 1983) und auch vom Metabolismus potentiell carcinogener Stoffe (Miller, 1978).

Die Promotion, eine zumindest zu Beginn reversible Phase (Pitot und Sirica, 1980), ist von nutritiven, hormonellen und Umgebungsfaktoren abhängig. Reine promovierende Substanzen führen ohne vorausgegangene Initiation nicht zur Ausbildung eines manifesten Tumors.

Für eine Vielzahl chemischer Substanzen ist die Fähigkeit bekannt, Hepatocarcinome zu erzeugen (Wogan, 1976; Preussmann, 1978). Alle diese Stoffe werden entweder durch Heterolyse oder durch metabolische Aktivierung in ihre ultimale Wirkform überführt, eine Ausnahme bilden die per se alkylierenden und azetylierenden Substanzen. Dies gilt auch für N-nitroso-Verbindungen, deren carcinogene Wirkung 1956 von Magee und Barnes zum ersten Mal beschrieben wurde. Sie werden in zwei Gruppen unterteilt, die Dialkylnitrosamine

(z.B. Dimethylnitrosamin) und die Alkylnitrosamide (z.B. Methylnitrosoharnstoff). Die Dialkylnitrosamine werden auf enzymatischem Wege aktiviert, während die Alkylnitrosamide durch Heterolyse in ihre ultimale Form umgewandelt werden (Miller, 1970).

Für die Interaktion dieser Substanzen mit der Zelle auf molekularer Ebene ist ihre elektrophile Eigenschaft von großer Bedeutung (Miller und Miller, 1974). Die meisten ultimalen Carcinogene sind elektrophil. Entsprechend binden sie an nukleophile Reaktionspartner (Miller, 1978). Die kovalente Bindung mit Makromolekülen erfolgt an nukleophile Zentren von DNA, RNA und Proteinen.

Bei den N-nitroso-Verbindungen findet die Alkylierung an den Purin- und Pyrimidinbasen statt (Magee und Farber, 1962; Druckrey et al., 1967). Die Methylierung an der N⁷-Position des Guanins konnten Magee und Farber 1962 zum ersten Mal experimentell nachweisen. Diese Bindung ist besonders häufig (Magee et al., 1975), spielt aber für die Initiation keine Rolle (Swann und Magee, 1968).

Ein wichtiger Schritt für die maligne Transformation scheint dagegen die Alkylierung an der O⁶-Position des Guanins zu sein (Loveless, 1969). Diese Alkylierung kann zu einer falschen Basenpaarung während der DNA-Replikation führen (Mehta und Ludlum, 1978; Abbott und Saffhill, 1979).

Eine langdauernde Persistenz von O⁶-Alkylguanin konnte an Zellen des ZNS gezeigt und mit der Wahrscheinlichkeit der später auftretenden ZNS-Tumoren korreliert werden (Kleihues und Margison, 1974; Goth und Rajewsky, 1974).



Weitere Untersuchungsergebnisse (Frei und Richie, 1964; Rabes et al., 1979) deuteten darauf hin, daß es bei der Initiation weniger auf die Größe der molaren Fraktion von O⁶-Methylguanin ankommt, sondern auf die Position der Zielzelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Exposition mit dem Carcinogen. Die für die Initiation empfindlichste Phase im Zellzyklus scheint die späte G₁- und die frühe S-Phase zu sein (Hartmann und Rabes, 1982; Müller und Rabes, 1983; Rabes et al., 1985).

Es gibt Hinweise, daß Hepatozyten die Fähigkeit besitzen, auf enzymatischem Weg durch eine O⁶-methyl-guanin-DNA-transferase (Olsson und Lindahl, 1980; Cairns et al., 1981; Pegg et al., 1983) das O⁶-Methylguanin zu eliminieren.

Die zellzyklusabhängige Konzentration der Methyl-Transferase ist in der transformationssensitivsten Phase, der frühen S-Phase relativ hoch (Rabes et al., 1985; Schuster et al., 1985). Damit besitzt die Zelle offenbar die Möglichkeit, die promutagene Läsion vor der Fixierung durch die Replikation in erhöhtem Umfang zu eliminieren. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß das Enzym durch seine Bindung mit dem Substrat verbraucht wird und für die Elimination der Methylgruppe des O⁶-Methylguanins dann nicht mehr zur Verfügung steht (Rabes et al., 1982b; Svenberg et al., 1982).

Entscheidend für die Fixation des durch das Carcinogen gesetzten Schadens an der DNA scheint der zeitliche Zusammenhang zwischen Alkylierung, DNA-Replikation und Reparatur zu sein. Findet die DNA-Replikation statt, bevor die Reparaturenzyme wirksam werden konnten, kann es mit größerer

Wahrscheinlichkeit zu einer fehlerhaften Basenpaarung kommen (Rabes et al., 1982b), die einen essentiellen Schritt während der Initiation darstellen dürfte (Rabes et al., 1985).

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde Diethylnitrosamin (DENA) gewählt, dessen starke hepatocarcinogene Wirkung durch Versuche von Schmähel und Mitarbeitern (1960) erstmals beschrieben wurde. Die Wirksamkeit von DENA bei Dauerbehandlung ist von Druckrey et al. (1967) untersucht worden. DENA, in seiner ursprünglichen Form ein Praecarcinogen (Miller und Miller, 1971), wird erst in der Leber in seine ultimale Wirkform umgewandelt. Dialkylnitrosamine werden in einem ersten Schritt der Aktivierung enzymatisch hydroxyliert und über verschiedene Zwischenformen zum Carboniumion, der eigentlichen Wirkform, umgewandelt.

DENA zeigt unter den Nitrosoverbindungen die höchste carcinogene Potenz (Druckrey et al., 1967). Die akute LD 50 liegt bei 280 mg/kg KG, ist jedoch für die carcinogene Wirkung von geringerer Bedeutung. Die hohe Spezifität ergibt sich aus dem Abstand von der kleinsten sicher wirksamen carcinogenen Dosis zur LD 50 in Prozent. Mit einer Tagesdosis von 0,1 mg/kg KG, was 0,035% der LD 50 entspricht, ist DENA im Vergleich zu anderen Carcinogenen hoch wirksam und spezifisch. Eine Gegenüberstellung der carcinogenen Wirksamkeit weiterer N-nitroso-Verbindungen findet sich bei Druckrey et al. (1967).

Die ausgeprägte Organotropie resultiert aus der Hydroxylierung, die vorwiegend im Hepatozyten abläuft. Damit stellt dieser Zelltyp die bevorzugte Zielzelle dar, und es

entstehen bei Dauerapplikation ausschließlich hepatozelluläre Carcinome (Thomas, 1961; Druckrey et al., 1967). DENA wird als hydrophile Substanz nicht im Fettgewebe gespeichert, verteilt sich schnell im ganzen Körper, erreicht so in kurzer Zeit im Zielorgan einen ausreichend hohen Spiegel und wird dort rasch metabolisiert (Bentley und Gesch, 1982).

Voraussetzung für die Fixierung einer promutagenen Läsion und die weitere Entwicklung in das Stadium der Neoplasie ist die Zellproliferation (Rabes, 1979). In der ruhenden menschlichen Leber sind Carcinome ein seltenes Ereignis. Bei gesteigertem Zellumsatz wie bei der Lebercirrhose oder der chronischen Hepatitis B, kann ein vermehrtes Auftreten von Lebertumoren beobachtet werden.

Während der praeneoplastischen Latenzperiode besitzen initiierte Zellen die Möglichkeit, sich bis ins Stadium des malignen Tumors fortzuentwickeln oder in einem früheren Stadium der praeneoplastischen Phase zu verharren (Farber, 1978). Um das Proliferationsverhalten der praeneoplastisch veränderten Zellen während der Latenzperiode besser analysieren zu können, ist die Unterscheidung der verschiedenen Stadien durch morphologische (Bannasch, 1976), funktionelle (Williams und Watanabe, 1978) und enzymhistochemische (Friedrich-Frekxa et al., 1969) Veränderungen von großer Bedeutung.

Praeneoplastische Zellpopulationen mit aberrierendem Enzymmuster spielen eine Rolle als Vorläufer in der Entwicklung zu Hepatocarcinomen (Rabes et al., 1972b).

Bei den enzymhistochemisch nachweisbaren Aberrationen praeneoplastischer Zellpopulationen unterscheidet man positive und negative Marker. Eine verminderte Aktivität findet sich bei der ATPase (Rabes et al., 1972b), der Glukose-6-Phosphatase (Gössner und Friedrich-Frekxa, 1964) und der Glykogenphosphorylase (Epstein et al., 1967). Zu den positiven Markern gehört eine vermehrte Glykogenspeicherung (Bannasch und Müller, 1964), der Nachweis der GGT (Fiala et al., 1973) und des Alpha-Fetoproteins (Okita, 1974; Koen et al., 1983). Das Auftreten weiterer charakteristischer Veränderungen wurde in Übersichtsartikeln zusammengestellt (Pitot und Sirica, 1980; Emmelot und Scherer, 1980; Bannasch, 1986). In den praeneoplastischen Arealen scheinen diejenigen Zellen einen Proliferationsvorteil zu besitzen, die die größte Anzahl an verschiedenen Enzymaberrationen aufweisen (Pugh und Goldfarb, 1978).

Am Beispiel des Enzyms Phosphoglyceratkinase, mit den Alloenzymen PGK-1A und PGK-1B, konnte gezeigt werden, daß praeneoplastisch veränderte Zellen der Enzymaberrationsbezirke (EAB) aus einer einzigen initiierten Zelle entstehen (Rabes et al., 1982a; Rabes et al., 1985). Sie sind somit klonaler Genese.

Anzahl und Größe der EAB nimmt mit der Dauer der DENA-Fütterung bis zu einer bestimmten Grenze kontinuierlich zu. Später stellt sich ein diskontinuierliches Verhalten in Bezug auf Größenwachstum und Proliferationsverhalten zwischen den einzelnen EAB ein. Dies spricht für einen unterschiedlichen Entwicklungsstand der EAB als Vorläufer der hepatocellulären Carcinome (Rabes et al., 1972b).

EAB werden zunehmend refraktär gegenüber einem Prolifera-

tionsreiz, wie die partielle Hepatektomie. So reagieren zu Beginn der praeneoplastischen Latenzperiode noch 90% der Hepatozyten, später nur noch 40% mit einer erhöhten Zellproliferation (Rabes et al., 1970). Die homöostatische Kontrolle könnte im Spätstadium der Praeneoplasie aufgehoben sein (Rabes et al., 1970; Rabes, 1979; Barbason und Betz, 1981a). Im fortgeschrittenen Entwicklungsstadium verringert sich in den EAB die Zellzykluszeit. Die Populationsverdoppelungszeit ist verkürzt (Rabes und Szymkowiak, 1979). Durch Abnahme der Proliferationsaktivität normaler Hepatozyten vergrößert sich der Wachstumsvorteil der Zellen in den EAB.

Nach Fixierung der promutagenen Läsion ist während der Latenzperiode die kontinuierliche Carcinogenexposition für eine Tumorinduktion nicht erforderlich. Das Carcinogen kann durch einen Promotor ersetzt werden. Für eine große Zahl von Substanzen ist eine promovierende Wirkung bei der Hepatocarcinogenese nachgewiesen worden (Pitot und Sirica, 1980). Phenobarbital (PB) ist ein wirksamer Promotor bei der Entstehung von Lebertumoren (Peraino et al., 1971, 1973; Weisburger et al., 1975; Kitagawa et al., 1979). Peraino et al. (1973) zeigten, daß der Zeitraum bis zum Auftreten maligner Tumoren von der Dauer der PB-Fütterung abhängig ist, während das Intervall zwischen dem Ende der letzten Carcinogenapplikation und dem Beginn der PB-Diät von geringerer Bedeutung ist.

PB führt in den praeneoplastischen Zellpopulationen zu einer erhöhten Proliferationsaktivität. Die DNA-Synthese ist gesteigert, in normalen Hepatozyten dagegen ist die Zellproliferation nur leicht erhöht (Schulte-Hermann et al., 1981).

Dies führt zu einem Wachstumsvorteil der veränderten Hepatozyten gegenüber dem Normalgewebe. Die Latenzphase wird somit durch PB verkürzt. Auch die Anzahl und Größe der enzymaberranten Zellpopulationen wird durch PB erhöht (Kitagawa und Sugano, 1978; Pitot et al., 1978; Schulte-Hermann et al., 1986).

PB führt zu einer veränderten Reaktion der Hepatozyten auf eine partielle Hepatektomie. Zu Beginn der Latenzperiode kommt es während der Regeneration der Leber zu einer erhöhten Synchronisation der DNA-Synthese (Tuczek et al., 1975; Rabes, 1976). Die Zellen zeigen sich in der späten Latenzphase refraktär gegenüber einem Proliferationsstimulus. Der circadiane Rhythmus und die mitotische Kontrolle der Zellregeneration sind gestört (Barbason et al., 1983). In diesem Stadium kann das Wachstumsverhalten dieser prae-neoplastisch veränderten Zellklone durch PB oder andere Promotoren nicht mehr beeinflußt werden (Barbason et al., 1979; Barbason und Betz, 1981b).

Eine wichtige Folge der malignen Transformation stellt der partielle Verlust der normalen homöostatischen Kontrolle dar. Eine Möglichkeit, diese Vorgänge näher zu erforschen, bietet die quantitative Analyse der Zellproliferation in prae-neoplastisch verändertem Gewebe nach einer Wachstumsstimulation, wie sie z.B. nach einer partiellen Hepatektomie gegeben ist.

Die Leber gehört zu den stabilen Geweben. Das bedeutet, daß unter physiologischen Bedingungen nur eine sehr geringe Zellproliferation stattfindet. Der Anteil DNA-synthetisierender Hepatozyten beträgt 0,1% (Rabes, 1969).

Aus zellkinetischen Analysen in der Leber nach partieller Hepatektomie ergab sich folgendes Bild: Bis 14 h nach partieller Hepatektomie befinden sich die Hepatozyten in der praesynthetischen Ruhephase. Ab der 15.-18. h steigt die Zahl DNA-synthetisierender Zellen steil an (Rabes und Brändle, 1969), erreicht zwischen 22 und 24 h ein Maximum und fällt danach wieder ab (Oehlert et al., 1962; Stöcker, 1966; Rabes et al., 1976, Rabes, 1976).

Die Menge und das Ausmaß der DNA-Synthese wird von verschiedenen exogenen und endogenen Faktoren beeinflusst. Der Eintritt der Hepatozyten in die DNA-Synthesephase erfolgt zeitlich gestaffelt, je nach Lage der Hepatozyten im Lobulus. Die DNA-Syntheseaktivität beginnt in der Periportalzone und schreitet zur Portalvene hin fort (Rabes, 1976). Abhängig vom Alter der Versuchstiere (Bucher et al., 1964) erreicht der Synchronisationsgrad nach partieller Hepatektomie nie mehr als 30-40% (Stöcker, 1966). Die regenerationsfähige Aktivität der Rattenleber nach einer 70% Resektion bis zur Wiederherstellung des ursprünglichen Lebergewichts dauert 2-3 Wochen (Higgins und Anderson, 1931; Leduc, 1964).

Mit Hilfe einer temporären Hemmung des G₁/S-Transits kann ein höherer Synchronisationsgrad während der Regeneration nach partieller Hepatektomie erreicht werden. Ein hierfür gut untersuchtes und häufig verwendetes Cytostatikum ist Hydroxyharnstoff (HU). HU wirkt toxisch auf DNA-synthetisierende Zellen, bei sonst geringer Hepatotoxizität (Farber und Baserga, 1969). HU hemmt den Eintritt der Zellen in die DNA-Synthesephase, es kommt zu einer Akkumulation der Zellen an der G₁/S-Grenze (Rabes et al., 1977). Durch HU kommt es

zu einer reversiblen Hemmung der DNA-Synthese, aber nicht zu einer Hemmung der RNA- und Proteinsynthese, eine Eigenschaft, die als "unbalanced growth" bezeichnet wird (Cohen und Barner, 1954).

HU inhibiert die Reduktion von Ribonukleotiden zu Desoxyribonukleotiden (Young et al., 1967) durch Hemmung der Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase (Young and Hodas, 1964; Krakoff et al., 1968). Die DNA-Synthesedauer und die Zellzykluszeit sind nach Absetzen des HU-Blocks verkürzt (Pfeiffer und Tolmach, 1967; Rajewsky, 1970; Rajewsky et al., 1971; Rabes et al., 1977).

Um die Hepatozyten am Eintritt in die DNA-Synthesephase zu hindern, ist es notwendig, die HU-Dauerinfusion zu einem Zeitpunkt zu beginnen, zu dem sich die Zellen noch in der G₁-Phase befinden. Dies ist 14 h nach partieller Hepatektomie der Fall (Rabes und Tuzcek, 1970). Eine Infusionszeit von 10 h synchronisiert relativ viele Hepatozyten bei geringer Zytotoxizität (Rabes et al., 1986). Nach einer HU-Dauerinfusion über 30 h kommt es zu einer gleichzeitigen DNA-Synthese bei 80% der Hepatozyten. Eine sich auf die Dauer der Zellzykluszeit erstreckende HU-Infusion führt jedoch nicht zu einer 100prozentigen Synchronisation der DNA-Synthese, es ergeben sich Anzeichen einer toxischen Schädigung der Leber (Iseler, 1977; Rabes et al., 1977).

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, Abweichungen in der homöostatischen Kontrolle des Proliferationsverhalten bei praeneoplastischen Zellen in EAB quantitativ zu ermitteln. Ausgegangen wurde von dem Modell der durch eine partielle Hepatektomie proliferationsstimulierten und durch HU

synchronisierten regenerierenden Rattenleber. Dabei war zu untersuchen, in wie weit der Promotor Phenobarbital die Proliferationskinetik in praeneoplastischen Herden gegenüber dem normalen Lebergewebe verändert. Die Ergebnisse sollten mit den Resultaten von Lebergewebe verglichen werden, das zwar dem promovierendem Einfluß von Phenobarbital exponiert war, dessen Proliferationsverhalten jedoch nicht durch eine partielle Hepatektomie verändert und dessen DNA-synthetisierende Zellpopulation auch nicht durch einen HU-Block synchronisiert wurde.

In phenobarbitalbehandelter Leber wurde weiterhin die Wachstumsfraktion, der Anteil aller in die DNA-Synthesephase eintretenden Hepatozyten, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der PH bestimmt. Die Ergebnisse von praeneoplastisch veränderten Zellen und Normalgewebe wurden verglichen.

B. Material und Methoden

1. Versuchstiere

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden männliche Wistar-Ratten (Wistar AF/Han) eigener Zucht, mit einem Anfangsgewicht zwischen 93 und 110g verwendet. Sie wurden in Makrolon-Käfigen im klimatisierten Tierstall bei 12-Stunden-Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und erhielten Wasser und Futter (Altromin®-Standarddiät, Lage) beziehungsweise Phenobarbital (Altromin®-Sonderdiät, Lage, mit 0,05% Phenobarbital-Na) ad libitum.

2. Gewichtskontrolle der Versuchstiere

Einmal wöchentlich, am Montag, wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Kranke Tiere, die durch starken Gewichtsverlust auffielen, wurden ausgesondert; die zu applizierende Dosis an Carcinogen und Hydroxyharnstoff wurde nach dem Tiergewicht berechnet. Unter denselben Versuchsbedingungen wurde, ebenfalls wöchentlich, das Gewicht einer Kontrollgruppe von 12 Tieren ohne Carcinogenbehandlung ermittelt.

3. Einteilung in verschiedene Versuchsgruppen

Für die Untersuchungen wurden die 3 Versuchsgruppen A, B und C gewählt (Abb. 1). Die Tiere aller drei Gruppen bekamen 4 Wochen lang, jeweils an den ersten 5 Wochentagen, das Carcinogen DENA i.p. injiziert. Nach 28 Tagen wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt und 91 Tage lang mit dem Promotor Phenobarbital gefüttert.

91 Tage nach der letzten DENA-Injektion wurden die Tiere der Gruppe A 2/3-teilhепatektomiert und 14 Stunden nach Beendigung der partiellen Hepatektomie mit Hydroxyharnstoff dauerinfundiert.

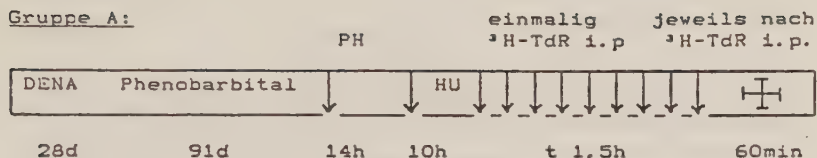
10 Stunden nach Beginn der Dauerinfusion wurde der Hydroxyharnstoffblock abgesetzt und den Versuchstieren der Gruppe A im Abstand von 1,5 Stunden, von der Stunde 0,0 bis 12,0, eine einmalige Injektion mit Tritium-markiertem Thymidin i.p. appliziert.

Den Tieren der Gruppe B wurde nach 91 Tagen Phenobarbitalfütterung die Leber zu 2/3 reseziert. Unmittelbar nach der Hepatektomie bekamen die Tiere eine Dauerinfusion mit ^3H -TdR für 12, 24, 48 und 72 Stunden.

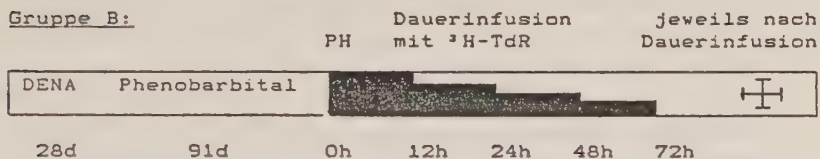
Den Tieren der Versuchsgruppe C, die zur Bestimmung der basalen Proliferation dienten, wurde nach 91 Tagen Phenobarbitalfütterung das ^3H -TdR i.p. injiziert. Diese Tiere wurden nicht 2/3 hepatektomiert und erhielten keine HU-Dauerinfusion.

Die Tiere der Gruppen A und C wurden 1 Stunde nach der ^3H -TdR Injektion, der Gruppe B nach Beendigung der ^3H -TdR-Dauermarkierung mit einer Überdosis Ether getötet und die Leber entnommen.

Gruppe A:



Gruppe B:



Gruppe C:

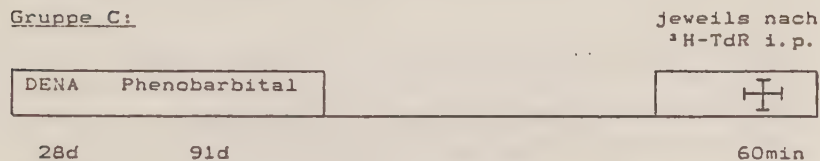


Abb. 1: Die Tiere der Gruppe A wurden mit DENA behandelt und 91 Tage nach Beginn der PB-Fütterung 2/3-hepatektomiert. Nach einer zehnstündigen Dauerinfusion mit HU wurde den Tieren zu verschiedenen Zeitabständen nach Beendigung der Infusion $^3\text{H-TdR}$ i.p. injiziert. Sie wurden nach 1 Stunde getötet. Tiere der Gruppe B erhielten unmittelbar im Anschluß an die Resektion eine $^3\text{H-TdR}$ Dauerinfusion über 12, 24, 48 und 72 h. Die Gruppe C diente als Kontrollgruppe zur Bestimmung der basalen Proliferation, ohne Proliferationssteigerung und ohne HU-Behandlung.

4. Carcinogen und seine Applikation

Die Versuchstiere bekamen vier Wochen lang, jeweils von Montag bis Freitag, DENA (N-Nitroso-Diethylamin, Serva, Heidelberg, Reinheitsgrad 99%) in einer Dosis von 8 mg/kg KG i.p. injiziert. DENA wurde in eisgekühlter physiol. Kochsalzlösung (8,08 µl DENA in 3ml 0,15 M NaCl) gelöst.

DENA ist bereits nach 24 h vollständig metabolisiert (Magee u. Lee, 1964). Die akute LD 50 liegt bei einer Dosis von 280 mg/kg KG (Druckrey et al., 1967). Es erscheint als gesichert, daß DENA in der Dosierung von 8 mg/kg KG keinen hepatotoxischen Effekt hat und nicht kumuliert.

5. Dauerbehandlung mit Phenobarbital als Promotor

28 Tage nach der ersten DENA Injektion wurden die Tiere aller drei Versuchsgruppen in Einzelkäfige gesetzt. Das Standardfutter wurde durch phenobarbitalhaltiges Futter (Altromin®-Sonderdiät, Lage, mit 0,05% Phenobarbital-Na) ersetzt. Alle Tiere erhielten diese Phenobarbitaldiät bis zu ihrem Tode.

6. Partielle Hepatektomie

Die Tiere wurden morgens zwischen 6:00 und 10:00 Uhr, in einem mittlerem Abstand von 18 min operiert. Die Operation erfolgte nach der Methode von Higgins und Anderson (1931). Sie wurde mit autoklaviertem Nahtmaterial (Baumwollgarn Nr. 80, der Firma MEZ, Freiburg/Breisgau) und sterilisiertem Besteck durchgeführt.

Unter Ethernarkose wurde der Lobus medialis mit seinem linken und rechten Teil und der Lobus sinister lateralis exzidiert (Abb. 2). Dies entspricht etwa einem Anteil von 70% der Gesamtlebermasse (Higgins und Anderson, 1931). Um einen ausreichenden venösen Abfluß zu gewährleisten, wurde die Ligatur etwas distal vom Leberhilus gesetzt und ein kleiner Anteil des Lobus medialis in die Ligatur mit einbezogen. Eine venöse Stauung, kenntlich an der lividen Verfärbung der Leber, wurde bei dieser Art der Ligatur vermieden.

Nach Austupfen des ausgetretenen Blutes aus der Peritonealhöhle wurde die Bauchdecke durch fortlaufende Naht in zwei Schichten verschlossen.



Abb. 2: Schematische Darstellung der Rattenleber, Ventralansicht.

7. Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion

Die Tiere wurden in Makrolon-Einzelkäfige gesetzt und erhielten Wasser und Futter ad libitum. Durch eine gummiarmierte Öffnung im Käfig wurde der Schwanz nach außen geführt, fixiert, in Ethernarkose die Schwanzvene freiprepariert und kanüliert (Technik bei Iseler, 1977).

Die Hydroxyharnstoffinfusion wurde den Versuchstieren zwischen 20:00 und 0:00 Uhr angelegt.

Um die Hepatozyten frühzeitig und vollständig am Eintritt von der praesynthetischen Phase in die DNA-Synthesephase zu hindern, erhielt jedes Tier eine einmalige Bolusinjektion von 1,69 mmol HU/kg Körpergewicht (Hydroxyharnstoff, reinst, Serva, Heidelberg), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. Diese Menge an HU entspricht der 1,35 fachen Konzentration der stündlichen Infusionsdosis.

Daraufhin folgte eine zehnstündige HU-Infusion von 1,25 mmol/h/kg KG (Perfusor® IV, B. Braun, Melsungen, Stufe 2, Flußrate 0,56 ml/h). Diese Dosis ergibt nach einer Stunde eine HU-Konzentration von etwa 1,7 mM im Serum (Rabes et al., 1977).

8. ³H-Thymidin-Pulsmarkierung

Zur Erfassung der DNA-synthetisierenden Zellen wurde den Tieren Tritium-markiertes Thymidin intraperitoneal injiziert. Die Injektion erfolgte bei den Versuchstieren der Versuchsgruppe A in Zeitabständen von 1,5 h nach Absetzen

der HU-Dauerinfusion, bis zur Stunde 12,0. Den Tieren der Versuchsgruppe C wurde 91 Tage nach Beginn der PB-Fütterung das ^3H -TdR i.p. injiziert.

Für die Injektion wurde die ^3H -TdR-Originalampulle (1 mCi/ml $6\text{-}^3\text{H}$ -TdR, spezifische Aktivität 5 Ci/mmol, Amersham Buchler, Braunschweig) mit physiologischer Kochsalzlösung auf 200 $\mu\text{Ci/ml}$ verdünnt. Die Versuchstiere erhielten anschließend eine einmalige ^3H -TdR-Dosis von 0,8 $\mu\text{Ci/g KG}$.

Die Verfügbarkeit von ^3H -TdR liegt zwischen 20 und 40 Minuten (Schultze, 1968). Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurden die Tiere der Versuchsgruppen A und C durch eine Überdosis Ether getötet, die Leber entnommen und fixiert.

9. ^3H -Thymidin-Dauermarkierung

Für die ^3H -TdR-Dauermarkierung wurde eine osmotische Minipumpe (Alzet® Mini Osmotic Pump, Modell 2001, Alza Corporation, Palo Alto, Californien) verwendet.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten technischen Daten der Minipumpe. Nach Angabe des Herstellers wird das mittlere Ausstoßvolumen für 7 Tage konstant gehalten.

Länge	:	2,5	cm
Außendurchmesser	:	0,7	cm
Leergewicht	:	1,1	g
Füllungsvolumen	:	233,9	± 11,5 µl
Ausstoßvolumen	:	0,97	± 0,05 µl/h

Tabelle 1: Technische Daten der osmotischen Minipumpe
(Alzet® Mini Osmotic Pump, Modell 2001,
Alza Corporation, Palo Alto, Californien).

Die gefüllte osmotische Minipumpe wurde unmittelbar nach der partiellen Hepatektomie frei in das Abdomen der Versuchstiere eingelegt und anschließend die Bauchdecke verschlossen.

Entsprechend einem osmotischen Gradienten kommt es zum Einstrom von Körperflüssigkeit durch die semipermeable Membran der Pumpe. Der dadurch steigende Kapselinnendruck führt zur Kompression des Reservoirs und zur kontinuierlichen Freisetzung seines Inhalts. Eine Schemazeichnung der osmotischen Minipumpe zeigt Abb. 3.

Die Minipumpen wurden mit 1,46 mCi ³H-TdR (Methyl-³H-TdR, spezifische Aktivität 2 Ci/mmol, Amersham Buchler, Braunschweig) gefüllt. Die Versuchstiere erhielten eine Dosis von 0,018 µCi/g/h über 12, 24, 48 und 72 Stunden. Sie wurden anschließend durch eine Überdosis Ether getötet, die Pumpen entnommen, die Leber herauspräpariert und fixiert.

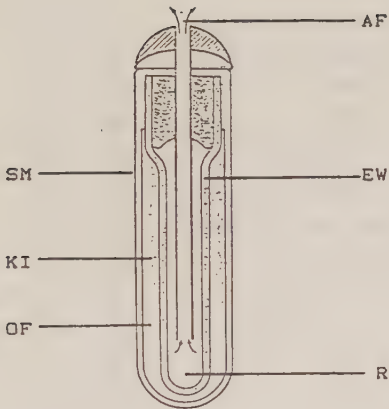


Abb. 3: Aufbau der osmotischen Minipumpe

SM = Semipermeable Membran
KI = Kapselinnenraum
OF = osmotisch wirksames Agens
R = Reservoir für die zu infundierende Flüssigkeit
AF = Ausströmöffnung
EW = Elastische Wand

10. Herstellung der enzymhistochemischen Präparate

Für die ATPase-Färbung werden jeweils vom Lobus dexter und caudatus fünf 8 µm dicke Kryostatschnitte (Kryostat Dittes-Duspiva, Heidelberg) bei -14° C in Stufen von 200 µm angefertigt, für die GGT-Färbung pro Leberlappen jeweils drei 2 µm dicke Paraffinschnitte.

10.1. ATPase-Präparate

Der enzymhistochemische Nachweis der EAB erfolgt nach der modifizierten Methode von Wachstein und Meisel (1957).

Als Inkubationslösung wurden 10 mg Substrat (ATP Nr. 15028 NAAH, Boehringer, Mannheim) in 5 ml A. bidest gelöst und mit einer zweiten Mischung aus 10,0 ml Tris-Maleat-Puffer (0,2 M, pH 7,5), 2,0 ml Magnesiumsulfat (0,1 M), 1,5 ml A. bidest und 1,5 ml Bleinitrat (2%) vermischt, filtriert und die Schnitte im Brutschrank bei 37°C 30 min im vorgewärmten Medium inkubiert. Anschließend wurden die Präparate lauwarm gespült, 2x in A. bidest gespült, 15 sec in Ammoniumsulfidlösung (2%) entwickelt, wieder 2x in A. bidest gespült und in 10% Formol 5 min fixiert. Nach 10 min fließendem Wässern wurden die Präparate in Glyceringelatine eingedeckt.

Mit dieser Methode erscheint die ATPase im histologischen Präparat braun-schwarz (Abb. 4).

10.2. GGT-Präparate

Für die GGT-Reaktion wurde der frisch entnommene Lobus dexter und Lobus caudatus 30 min in eisgekühltem Aceton fixiert, 2 h gewässert und nach der aufsteigenden Alkoholreihe im Autotechnikum (WKF-Forschungsgeräte, Brandau/Odw.) in Paraplast eingeschlossen. Nach der Herstellung der Schnitte wurden die Präparate entparaaffiniert, gewässert und anschließend 3 x 1 h in inaktivem Thymidin (Merck, Darmstadt) inkubiert, um das nicht in die DNA eingebaute ³H-Thymidin zu entfernen.

Der enzymhistochemische Nachweis der GGT-positiven Areale erfolgte nach der Methode von Rutenburg et al. (1969).

Als Inkubationsmedium wurden 25,0 mg GMNA (Gamma-Glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamide, Serva, Heidelberg), in 0,5 ml Dimethylsulfoxid, 0,5 ml NaOH (1 N) und 9,0 ml A. dest gelöst. 1 ml dieser GMNA-Lösung wurden mit einer zweiten Mischung aus 5 ml Trispuffer (0,1 M, pH 7,4), 14 ml NaCl (0,85%), 10mg Glycylglycine und 10 mg Fast-Blue-BBN³ vermengt, filtriert und die Schnitte im Brutschrank bei 37°C 30 min im vorgewärmten Medium inkubiert.

Anschließend wurden die histologischen Schnitte 2 min in NaCl (0,85%), 2 min in Kupfersulfat (0,1M) und kurz in NaCl (0,85%) gespült und in A. dest gewässert.

Die Kerne wurden 10 min in Haemalaun (Haemalaun nach Mayer, Merck, Darmstadt) gefärbt, 10 min unter fließendem Leitungswasser differenziert und anschließend mit Glycerin-gelatine eingedeckt.

Um ein Abblassen der Kerne zu verhindern, erfolgte die Autoradiographie vor der Haemalaunfärbung.

Mit dieser Methode erscheint die GGT in den praeneoplastischen Herden orange. Eine bei Hartmann (1981) beschriebene Verschollung der GGT-Färbung nach 24 Stunden konnte bei diesen Präparaten, wohl wegen der hier durchgeführten Acetonfixierung, nicht festgestellt werden (Abb. 5). Die Präparate waren auch noch nach einem halben Jahr gut auszuwerten. Danach stellte sich auch hier eine zunehmende Auskristallisation des orangen Farbstoffes ein (Abb. 6).

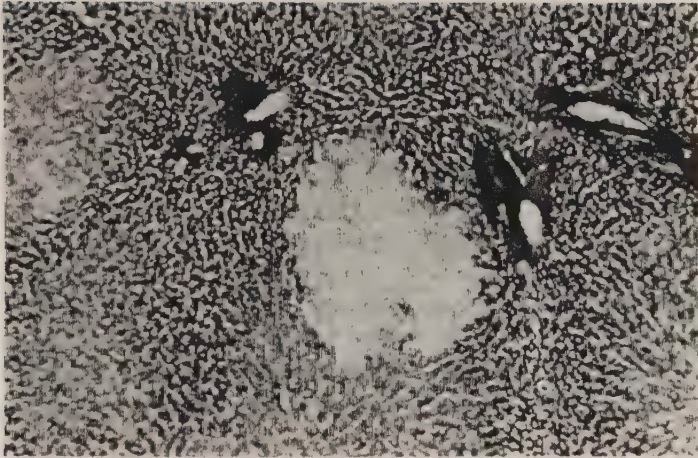


Abb. 4: Enzymhistochemische Färbung der ATPase in einem Leberschnitt, mit einem ATPase-negativen praeneoplastischen Herd.

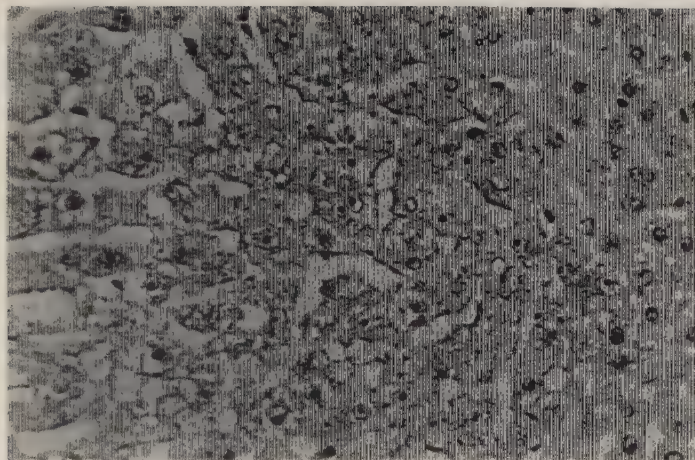


Abb. 5: Ausschnitt aus einem enzymhistochemisch gefärbten, GGT-positiven Bezirk.

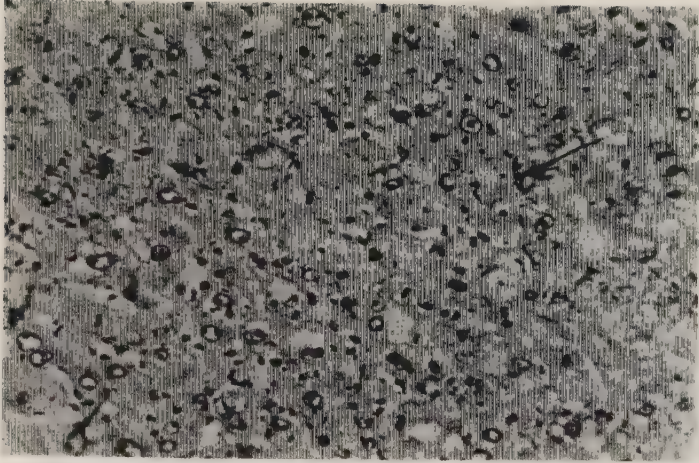


Abb. 6: Auskristallisation der GGT-Färbung, 2 Jahre nach der Herstellung des Präparates.

11. Autoradiographie

Nach der enzymhistochemischen Färbung für GGT wurden die Schnitte in der Dunkelkammer bei Raumtemperatur und 70% Luftfeuchtigkeit nach der Dipping-Methode (Amlacher, 1974; Steel, 1977) mit einer fotoempfindlichen Emulsion (Ilford K2, Essex, England), die 1:1 mit A. bidest verdünnt und auf 42°C vorgewärmt war, überzogen. Nach einer Expositionszeit von 14 Tagen bei +4°C wurden die Schnitte 12 min entwickelt, gewässert, 3-5 min fixiert und weitere 20-30 min unter fließendem Wasser und anschließend mit A. dest gespült. Nach dem Trocknen erfolgte die Kernfärbung mit Haemalaun.

12. Auswertung

Zu jedem Zeitabschnitt nach dem Ende der HU-Infusion bzw. nach der ^3H -TdR-Dauermarkierung standen 3 Tiere für die Auswertung zur Verfügung. Die benötigten Daten wurden, nach Leberlappen getrennt, für jedes Versuchstier einzeln ermittelt.

Zunächst wurde der unspezifische Background (Nulleffekt), i.e. die Entwicklung von Silberkörnern, die nicht durch radioaktive Strahlung von inkorporiertem ^3H -TdR verursacht wird, für jedes Präparat bestimmt. Er ist durch physikalische, chemische und mechanische Faktoren beeinflussbar (Lennartz, 1978). Unter dem Mikroskop wurden mittels eines Rasterokulars in 500 Einzelquadraten (je $237 \mu\text{m}^2$) die Anzahl an Silberkörnern über einem kernfreien Areal gezählt. Anschließend erfolgte die Umrechnung der Silberkorndichte pro durchschnittliche Kernfläche ($56 \mu\text{m}^2$). Eine Zelle galt

als markiert, wenn sich mindestens 5 Silberkörner über einem Zellkern mittlerer Kernfläche befanden und der Background <1 pro kern-äquivalenter Fläche betrug.

In der Auswertung wurden folgende Parameter bestimmt:

a: GGT-Präparate

1. ^3H -TdR-MI im Normalgewebe
2. MI in den einzelnen EAB
3. Anzahl der EAB
4. Fläche der einzelnen EAB
5. Gesamtschnittfläche der einzelnen Präparate
6. Einzelne GGT-positive Zellen in den Schnitten

b: ATPase-Präparate

1. Anzahl der EAB
2. Schnittfläche der einzelnen Präparate

Bei der Berechnung der EAB-Flächen wurden in den Präparaten am Rande liegende EAB, deren Flächen nur zum Teil angeschnitten waren, nicht berücksichtigt. Für den MI wurden diese Rand-EAB jedoch verwendet. Die kleinsten in die Auswertung einbezogenen EAB bestanden aus 5 Zellen.

Zur Errechnung des Markierungsindex im Normalgewebe wurde bei 630facher Vergrößerung (Ölimmersion) 2000 Hepatozyten mäanderförmig ausgezählt und der Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzahl der Hepatozyten bestimmt.

Nach der Bestimmung der Anzahl der EAB und ihrer Markierungsindices erfolgte die Ermittlung der Fläche der einzelnen enzymaberranten Bezirke. Die Flächen wurden mit einem Zeichentubus vom Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) auf ein Papier übertragen. Der Vergrößerungsfaktor Präparat zu Papier betrug bei einer 100fachen Mikroskopvergrößerung 333,33, bei 250facher Vergrößerung 133,33. Er wurde mittels eines Eichmikrometers bestimmt.

Über ein Videoplansystem (Kontron, Eching) wurden die Flächen der einzelnen EAB und die Schnittflächen der Präparate in den Computer eingelesen. Das System besteht aus einem Magnetmeßtablett mit einem Auswertestift (Cursor), einem Projektionsgerät (WZFO, Warschau, Polen), mit dem die histologischen Präparate auf das Meßtablett projiziert wurden, einem Bildschirm, einem Drucker und der Recheneinheit.

Für die Auswertung standen verschiedene Programme zur Verfügung: Ein Meßprogramm zur Flächenbestimmung, ein Statistikprogramm und ein Klassifikationsprogramm für die Erstellung von Scatterdiagrammen.

Die auf ein Papier gezeichneten Flächen der EAB wurden auf dem Magnettisch mit dem Cursor umfahren und so in den Computer eingegeben. Zur Bestimmung der Schnittfläche der einzelnen Präparate wurden die Schnitte über das Projektionsgerät auf den Magnettisch abgebildet und, wie oben erwähnt, ebenfalls in den Rechner eingegeben.

Die endgültigen Meßwerte, durch einen geeigneten Vergrößerungsfaktor korrigiert, konnten in der richtigen Dimension (mm² bzw. cm²) auf einer Datendiskette gespeichert und über den Drucker ausgegeben werden.

Für die ATPase-Präparate wurde die Anzahl der EAB pro cm² Gesamtfläche in der beschriebenen Weise ermittelt.

13. Statistische Auswertung

Zur besseren Beurteilung und zum Vergleich der Ergebnisse wurde eine Basisstatistik mit Hilfe eines Statistikprogramms auf dem Kontron Computer und einem Taschenrechner (Hewlett Packard, 41CV) durchgeführt.

Die statistischen Ergebnisse wurden nach folgenden Formeln (Sachs, 1969) errechnet.

$$\text{Mittelwert :} \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$\sum x$ = Summe aller Einzelstichproben
 $x_1 + x_2 + \dots + x_n$

n = Anzahl der Stichproben

Standardabweichung (SD) :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x = Einzelstichprobe

$\bar{x}$ = Mittelwert

n = Anzahl der Stichproben

Bei der Angabe der Ergebnisse wurden Mittelwerte aus >10 Einzelwerten auf eine Dezimale gerundet, <10 ohne Dezimale angegeben.

Um die Signifikanz des Unterschiedes zu prüfen, wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes der U-Test durchgeführt. Der U-Test gilt für Stichproben, die nicht normalverteilt sind. Der Vertrauensbereich wurde definitionsgemäß bei 95% angesetzt.

Zur Qualitätskontrolle der mechanischen Auswertung am Mikroskop wurde jeweils eine Auswerteeinheit, bestehend aus allen Ergebnissen für einen Zeitabschnitt, herausgegriffen und die Korrelation zwischen Gesamtzellzahl und EAB-Fläche berechnet. Ein Beispiel zeigt Abb. 7. Unter der Voraussetzung einer direkten Korrelation, mit dem hier errechneten Korrelationskoeffizienten von 0,99, kann festgestellt werden, daß die Ergebnisse nur wenig von der ermittelten Geraden abweichen.

Daraus ergibt sich, daß sowohl die Auswertung der Gesamtzellzahl in den EAB als auch die Bestimmung der EAB-Flächen mit ausreichender Genauigkeit durchgeführt wurden.

Gesamtzellzahl

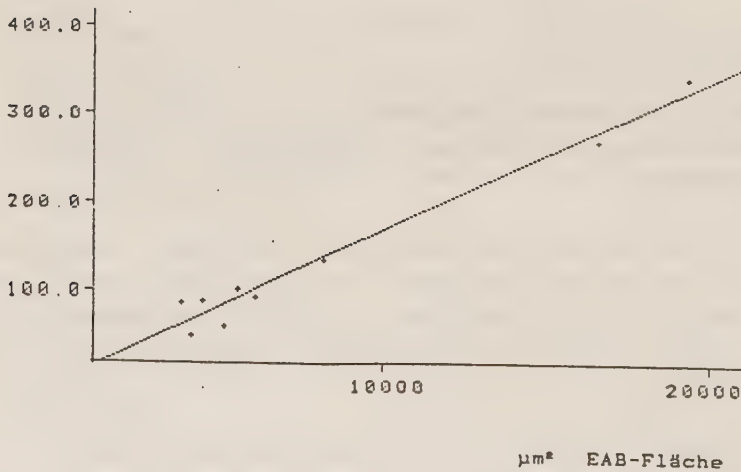


Abb. 7: Verhältnis der Gesamtzellzahl einzelner EAB zu ihren Flächen

C. Ergebnisse

1. ³H-Thymidin-Pulsmarkierung

1.1. Tabellarische und graphische Zusammenfassung

14 Stunden nach der partiellen Hepatektomie und 10 Stunden nach Beginn der HU-Infusion wurden die Tiere der Versuchsgruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Ende des HU-Blocks mit ³H-TdR i.p. injiziert und 1 Stunde später getötet. Tabelle 2 zeigt die Einzelergebnisse der Auswertung der GGT-Präparate, aufgeführt für die verschiedenen Zeitabschnitte, für jedes Tier und getrennt nach Leberlappen (Ld = Lob. dext., Lc = Lob. caud.).

Tabelle 2:

h nach HU		Mi Normal- gewebe (%)	Anzahl EAB	Gesamtzellzahl in allen EAB	³ H-TdR MI EAB (%)
Tier/Leber- lappen					
0,0 h					
1	Ld	3,2	12	1518	8,8
	Lc	3,9	10	824	11,4
2	Ld	2,8	16	882	8,2
	Lc	3,7	13	711	11,7
3	Ld	6,0	7	221	9,1
	Lc	2,2	12	755	10,7

Tabelle 2: Fortsetzung

h nach HU		Mi Normal- gewebe (%)	Anzahl EAB	Gesamtzellzahl in allen EAB	³ H-TdR MI EAB (%)
Tier/Leber- lappen					
1,5 h					
4	Ld	8,0	7	480	25,0
	Lc	7,4	34	1557	19,7
5	Ld	19,7	9	331	35,4
	Lc	22,8	8	845	33,6
6	Ld	14,8	0	0	n. b.
	Lc	16,1	0	0	n. b.
3,0 h					
7	Ld	31,8	0	0	n. b.
	Lc	52,9	0	0	n. b.
8	Ld	28,3	7	355	44,2
	Lc	35,6	3	234	36,8
9	Ld	20,6	6	1537	24,8
	Lc	25,4	7	513	43,3
4,5 h					
10	Ld	32,9	1	16	50,0
	Lc	39,8	2	88	47,7
11	Ld	29,0	3	196	39,8
	Lc	32,6	5	715	41,8
12	Ld	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
	Lc	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.

n. b. = nicht bestimmbar

Tabelle 2: Fortsetzung

h nach HU		Mi Normal- gewebe (%)	Anzahl EAB	Gesamtzellzahl in allen EAB	³ H-TdR MI EAB (%)
Tier/Leber- lappen					
6,0 h					
13	Ld	33,8	2	151	33,1
	Lc	38,8	0	n. b.	n. b.
14	Ld	44,7	7	499	40,1
	Lc	45,6	2	672	30,8
15	Ld	23,4	0	n. b.	n. b.
	Lc	36,6	0	n. b.	n. b.
7,5 h					
16	Ld	16,5	0	n. b.	n. b.
	Lc	17,6	0	n. b.	n. b.
17	Ld	25,9	2	575	18,4
	Lc	24,2	0	n. b.	n. b.
18	Ld	21,0	15	1126	25,3
	Lc	26,8	4	141	32,6
9,0 h					
19	Ld	7,1	6	659	7,4
	Lc	11,3	9	602	26,7
20	Ld	14,6	7	787	29,2
	Lc	18,6	1	151	33,8
21	Ld	16,8	12	2184	22,0
	Lc	18,6	4	301	20,3

n. b. = nicht bestimmbar

Tabelle 2: Fortsetzung

h nach		Mi Normal-	Anzahl	Gesamtzellzahl	³ H-TdR MI
HU		gewebe (%)	EAB	in allen EAB	EAB (%)
Tier/Leber-					
lappen					
10,5 h					
22	Ld	22,4	28	2236	23,5
	Lc	24,8	19	1151	24,5
23	Ld	17,7	29	1147	20,2
	Lc	17,9	19	1599	17,8
24	Ld	19,2	17	645	23,1
	Lc	26,9	6	710	32,0
12,0 h					
25	Ld	28,5	8	124	38,1
	Lc	28,9	2	192	37,5
26	Ld	22,5	14	691	27,1
	Lc	28,9	8	564	36,7
27	Ld	14,3	47	1856	19,3
	Lc	27,6	16	844	30,1

n.b. = nicht bestimmbar

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, traten bei einigen Tieren keine GGT⁺ foci auf, der MI konnte hier nicht bestimmt werden, diese Tiere gingen nicht in die Ergebnisberechnung ein. 4,5 Stunden nach dem Ende der HU-Infusion wurden bei Tier Nr. 12 keine markierten Zellen gefunden; dies könnte auf eine fehlerhafte ³H-TdR-Injektion zurückzuführen sein. Für die Ergebnisse wurden die Gesamtzahl der Hepatozyten und der Anteil der markierten Zellen aller GGT⁺ foci pro Leberlappen summiert und daraus der MI berechnet. Der MI im Normalgewebe wurde randomisiert aus 2000 Hepatozyten ermittelt (siehe Material und Methoden).

Bei dem Vergleich der Einzelergebnisse fällt auf, daß sowohl die Anzahl der GGT⁺ foci als auch die Gesamtzellzahl aller GGT⁺ foci pro Leberlappen stark schwanken. Für einen Leberlappen können als Minimalwert 16 Hepatozyten in 1 GGT⁺ focus angemerkt werden, als Maximalwert 2236 Hepatozyten in 28 GGT⁺ foci. Die unterschiedliche Aussagekraft der einzelnen Ergebnisse muß bei der Bewertung berücksichtigt werden. Eine Gesetzmäßigkeit der Verteilung der MI in den verschiedenen Leberlappen ist aus den Werten nicht zu ermitteln.

91 Tage nach der PB-Fütterung erfolgte bei den Tieren der Versuchsgruppe C die Pulsmarkierung mit ³H-TdR. Zur Bestimmung der basalen Proliferation wurden diese Tiere weder teilhepatektomiert noch mit HU infundiert. Die Ergebnisse der Auswertung für die verschiedenen Parameter sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Basale Prolifera- tion		Mi Normal- gewebe (%)	Anzahl EAB	Gesamtzellzahl in allen EAB	³ H-TdR MI EAB (%)
28	Ld	0,5	25	2990	1,0
	Lc	0,4	20	1158	0,6
29	Ld	0,3	22	594	0,5
	Lc	0,4	11	193	1,0
30	Ld	0,2	25	2254	1,4
	Lc	0,4	18	1165	1,1

Tabelle 3: Ergebnisse der basalen Proliferation

Bei der mikroskopischen Auswertung wurden markierte und unmarkierte GGT* Einzelzellen in den durchgesehenen Präparaten notiert (Tabelle 4). Da die Ergebnisse stark streuen, kann eine Regelmäßigkeit in der Verteilung nicht angenommen werden.

Tabelle 4: Auswertung der GGT* Einzelzellen

-----				-----			
h nach HU		einzelne GGT* Zellen		h nach HU		einzelne GGT* Zellen	
Tier/Leber-		mark.	unmark.	Tier/Leber-		mark.	unmark.
lappen		-----		lappen		-----	
0,0 h				4,5 h			
1	Ld	10	44	10	Ld	0	0
	Lc	11	48		Lc	0	0
2	Ld	7	35	11	Ld	1	2
	Lc	11	26		Lc	0	0
3	Ld	0	0	12	Ld	n.b.	n.b.
	Lc	5	15		Lc	n.b.	n.b.
-----				-----			
1,5 h				6,0 h			
4	Ld	4	19	13	Ld	0	0
	Lc	10	35		Lc	0	0
5	Ld	2	5	14	Ld	0	0
	Lc	2	1		Lc	0	0
6	Ld	0	1	15	Ld	5	0
	Lc	0	0		Lc	23	28
-----				-----			
3,0 h				7,5 h			
7	Ld	0	1	16	Ld	0	0
	Lc	0	0		Lc	0	0
8	Ld	7	8	17	Ld	0	0
	Lc	2	0		Lc	0	0
9	Ld	1	2	18	Ld	5	13
	Lc	0	4		Lc	1	3
-----				-----			

n.b. = nicht bestimmbar

Tabelle 4: Fortsetzung

-----				-----			
h nach HU		einzelne GGT* Zellen		h nach HU		einzelne GGT* Zellen	
Tier/Leber-lappen		mark.	unmark.	Tier/Leber-lappen		mark.	unmark.
-----				-----			
9,0 h				12,0 h			
19	Ld	1	6	25	Ld	3	4
	Lc	0	0		Lc	0	0
20	Ld	7	3	26	Ld	5	7
	Lc	0	0		Lc	6	5
21	Ld	2	7	27	Ld	6	22
	Lc	1	3		Lc	1	8
-----				-----			
10,5 h				Basale Proliferation			
22	Ld	5	7	28	Ld	1	13
	Lc	1	6		Lc	2	29
23	Ld	1	9	29	Ld	0	0
	Lc	2	4		Lc	0	8
24	Ld	1	3	30	Ld	0	9
	Lc	1	0		Lc	0	0
-----				-----			

n.b. = nicht bestimmbar

In den folgenden Tabellen 5-8 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Für jeden Zeitpunkt nach Absetzen des HU setzen sie sich zusammen aus der Summe der Einzelwerte beider Leberlappen für jeweils 3 Tiere. Abweichungen in der Zahl der Einzelwerte gehen aus Tabelle 2 hervor.

h nach HU	MI Normalgewebe Mittelwert (%)	³ H-TdR-MI EAB Mittelwert (%)
0,0	3,6 ± 1,3	9,9 ± 1,5
1,5	14,8 ± 6,2	25,8 ± 7,4
3,0	32,4 ± 11,3	32,0 ± 9,0
4,5	33,6 ± 4,5	42,0 ± 4,8
6,0	37,1 ± 8,2	34,6 ± 4,8
7,5	22,9 ± 3,4	24,0 ± 5,8
9,0	14,5 ± 4,6	22,0 ± 9,6
10,5	21,5 ± 3,8	22,7 ± 3,9
12,0	25,1 ± 5,9	27,3 ± 7,5
Basale Proliferation	0,3 ± 0,1	1,1 ± 0,3

Tabelle 5: Gegenüberstellung des ³H-TdR-MI (%) im Normalgewebe und in den GGT⁺ foci zu verschiedenen Zeitabschnitten nach dem HU-Block und für die basale Proliferation. Mittelwert ± Standardabweichung.

h nach HU	mm ² EAB x 100	
	cm ² Gesamtfläche	
0,0	83,7	± 56,4
1,5	49,9	± 49,0
3,0	60,0	±101,1
4,5	11,4	± 26,7
6,0	24,2	± 38,5
7,5	15,7	± 21,3
9,0	35,5	± 42,5
10,5	69,9	± 35,7
12,0	24,2	± 16,9
Basale Proliferation	130,1	± 87,3

Tabelle 6: Fläche der GGT⁺ foci in mm² x 100 pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche. Mittelwert ± Standardabweichung.

h nach HU	Anzahl EAB
	cm² Gesamtfläche
0,0	28,0 ± 14,1
1,5	19,0 ± 20,0
3,0	6,6 ± 7,0
4,5	3,9 ± 3,5
6,0	2,5 ± 2,8
7,5	3,5 ± 3,9
9,0	6,4 ± 4,2
10,5	23,3 ± 10,8
12,0	15,0 ± 8,2
Basale Proliferation	64,8 ± 35,0

Tabelle 7: Anzahl der GGT+ foci pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche. Mittelwert ± Standardabweichung.

h nach HU	Anzahl EAB	
	cm ² Gesamtfläche	
0,0	12,8	± 10,9
1,5	3,7	± 2,6
3,0	5,6	± 4,1
4,5	9,3	± 4,7
6,0	7,8	± 7,6
7,5	14,0	± 5,7
9,0	7,8	± 3,7
10,5	16,2	± 7,0
12,0	10,5	± 3,1
Basale Proliferation	17,9	± 9,2

Tabelle 8: Anzahl der ATPase- foci pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche. Mittelwert ± Standardabweichung.

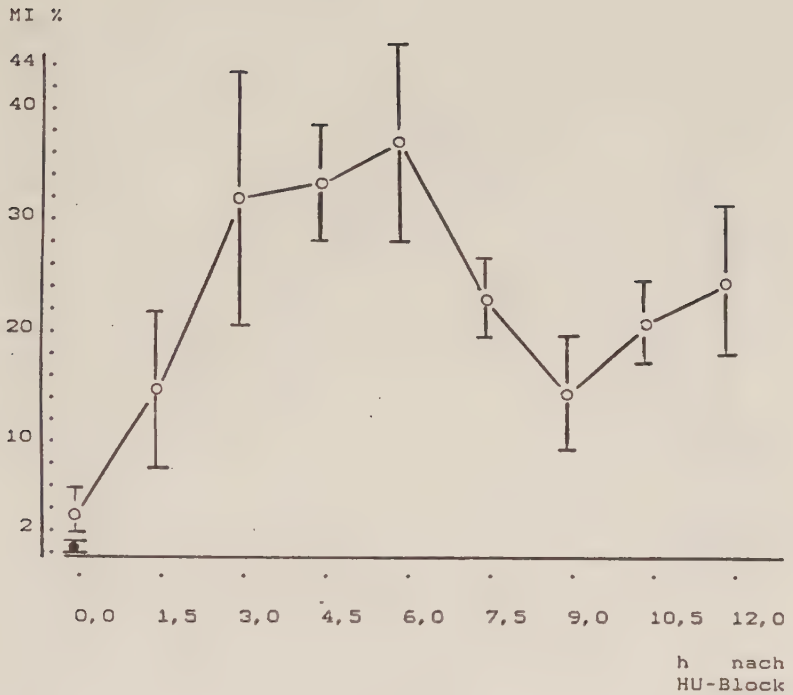


Abb. 8: ³H-TdR-MI (%) für Normalgewebe (O — O) zu verschiedenen Zeitabständen nach dem Ende des HU-Blocks, im Vergleich zu Normalgewebe, ohne PH und ohne HU-Synchronisation (■). Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

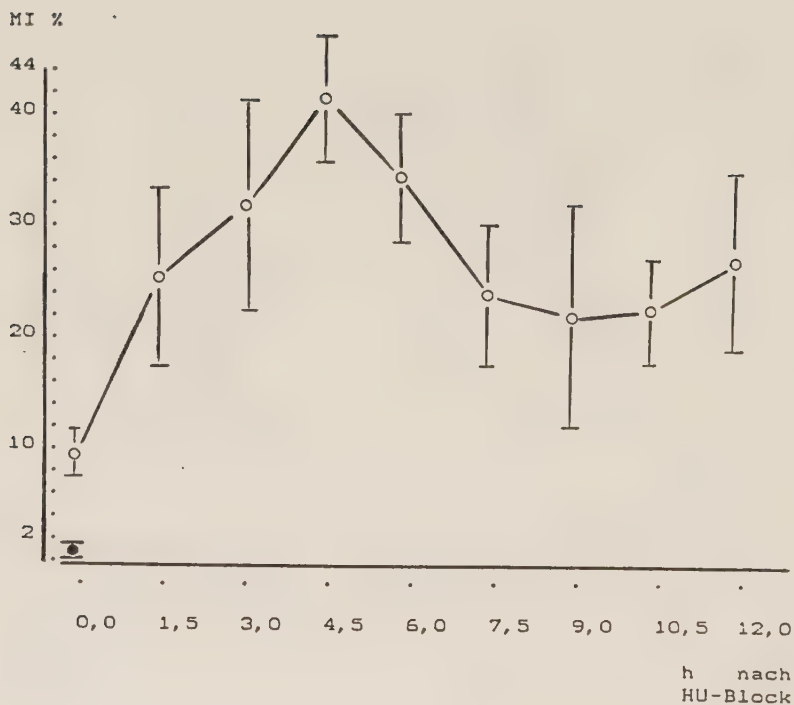


Abb. 9: ^3H -TdR-MI (%) für GGT⁺ foci zu verschiedenen Zeitabschnitten nach dem Ende des HU-Blocks (O — O), im Vergleich zu GGT⁺ foci ohne PH und ohne HU-Synchronisation ($\bullet$). Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

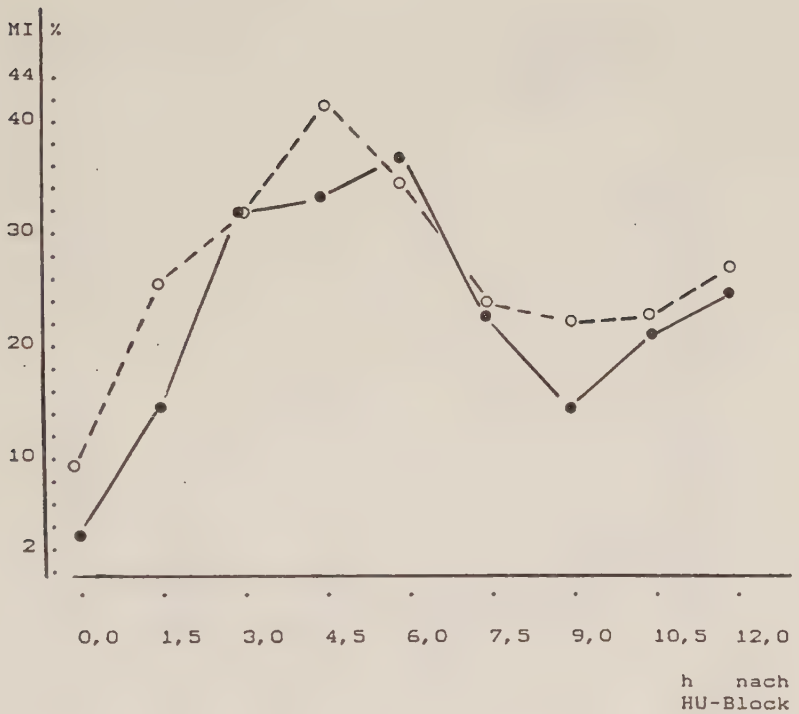


Abb. 10: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus Abb. 8 und 9. MI (%) für das Normalgewebe (● — ●) und die GGT+ foci (○ --- ○).

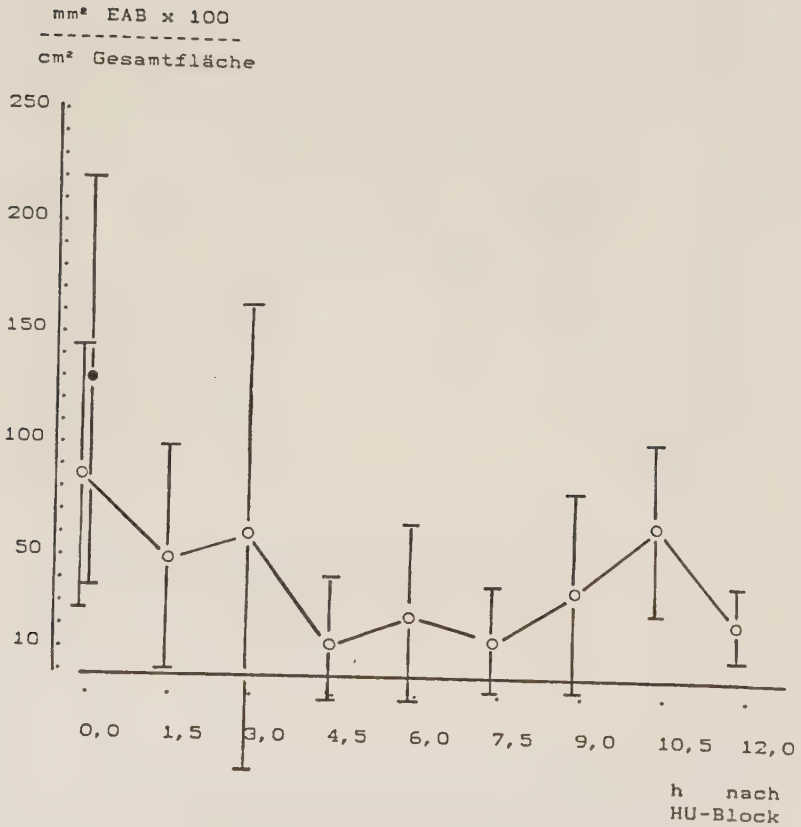


Abb. 11: Fläche der GGT⁺ foci in mm² x 100 pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche für die HU-synchronisierte, regenerierende Rattenleber, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach HU-Block (O — O) und die Ergebnisse für die Tiere ohne PH und ohne HU-Synchronisation (●). Mittelwert ± Standardabweichung.

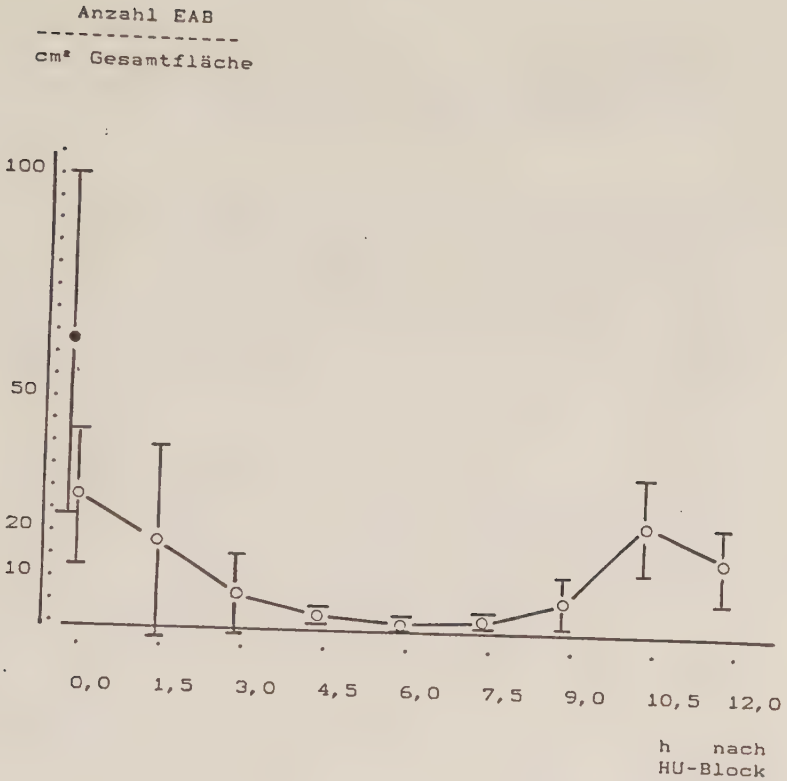


Abb. 12: Anzahl der GGT⁺ foci pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach HU-Block (O — O) im Vergleich zu Tieren ohne PH und ohne HU-Synchronisation (■). Mittelwert ± Standardabweichung.

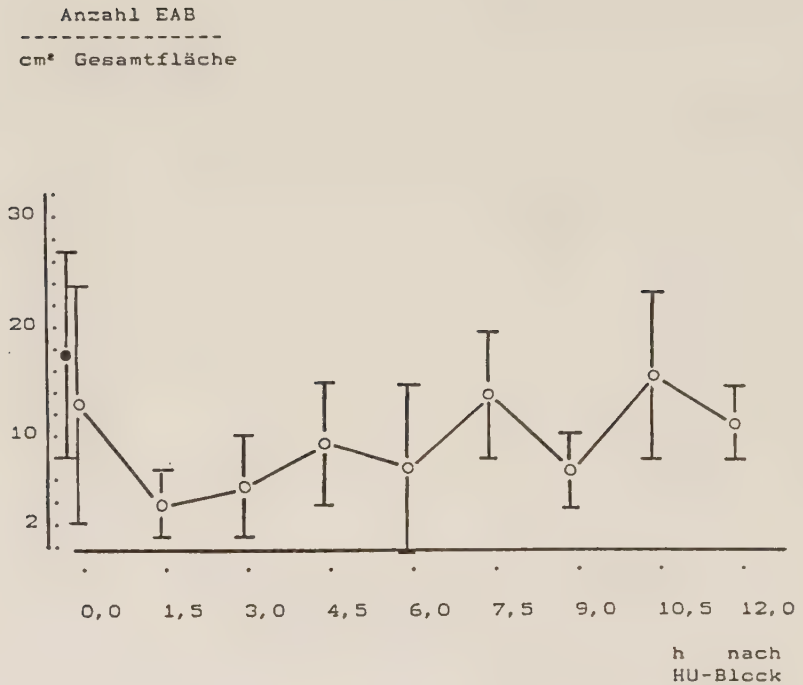


Abb. 13: Anzahl der ATPase- foci pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach HU-Block (O — O) im Vergleich zu Tieren ohne PH und ohne HU-Synchronisation (■). Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

1.2. Erläuterung der Ergebnisse zur ^3H -TdR-Pulsmarkierung

1.2.1. Markierungsindices im Normalgewebe und in Enzym-aberrationsbezirken

Der MI des Normalgewebes (Tabelle 5, Abb. 8) liegt nach Beendigung des Zellzyklusblocks bei teilhepatektomierten Versuchstieren mit 3,6% signifikant über dem Niveau für basal proliferierendes Gewebe (Tabelle 5) mit 0,3%. Er steigt relativ steil an und hat sein Maximum nach 6,0 h mit 37,1%. Nach einem Abfall bis 14,5% bei 9,0 h erreicht er ein erneutes Maximum mit 25,1% zur Stunde 12,0.

Der MI der GGT⁺ foci, deren Zellen nicht durch eine 2/3-Hepatektomie zur Proliferation angeregt wurden und deren Zellteilung nicht synchronisiert wurde (Tabelle 5, Abb. 9) liegt mit 1,1% signifikant unter dem Niveau der regenerierenden Leber.

Der MI in den GGT⁺ foci der regenerierenden Rattenleber (Tabelle 5, Abb. 9) beträgt nach dem Ende der Zellzyklusblockade 9,9%. Er steigt relativ steil an bis zu einem Maximum von 42,0% zum Zeitpunkt 4,5 h, fällt anschließend wieder ab und erreicht ein Minimum von 22,0% bei 9,0 h. Danach steigt der MI zu einem zweiten Peak nach 12,0 h mit 27,3% an.

Beim Vergleich von Abb. 8 und 9 ergibt sich, daß der Anteil der DNA-synthetisierenden Zellen an der Gesamtzellzahl für die basale Proliferation in den GGT⁺ foci mit 1,1% signifikant höher liegt als im Normalgewebe mit 0,3%. Der MI in der regenerierenden Rattenleber verhält sich in Normalgewebe und GGT⁺ foci (Abb. 10) etwa gleich. Signifikante Unterschiede

finden sich lediglich unmittelbar nach dem Absetzen des HU-Blocks; der MI in GGT⁺ foci liegt mit 9,9% signifikant höher als im Normalgewebe mit 3,6%.

1.2.2. Flächenanteil der Enzymaberrationsbezirke an der Gesamtfläche

Die Ergebnisse des Flächenanteils der GGT⁺ foci in mm² x 100 pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche zu verschiedenen Zeitpunkten nach der PH (Tabelle 6, Abb. 11) weisen eine sehr große Streuung auf; dies gilt sowohl für die regenerierende Leber als auch für Lebergewebe von Ratten, die nicht teilhepatektomiert und nicht mit HU infundiert wurden. Nur zwischen 9,0 und 10,5 Stunden kann ein signifikanter Anstieg von 35,5 auf 69,9 und zwischen 10,5 und 12,0 Stunden ein signifikanter Abfall von 69,9 auf 24,2 verzeichnet werden. Signifikante Unterschiede zu basal proliferierendem Gewebe können zu den Zeitpunkten 4,5 bis 9,0 und bei 12,0 Stunden errechnet werden.

1.2.3. Numerische Dichte der Enzymaberrationsbezirke

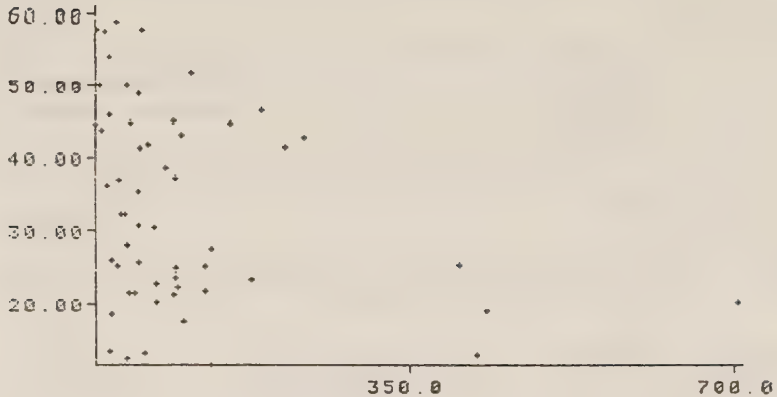
Bei der Betrachtung der Abb. 12 (Tabelle 7) ist ein signifikanter Rückgang und Wiederanstieg der Anzahl der GGT⁺ foci pro cm² Gesamtfläche von der Stunde 0,0 bis 12,0 auffällig. Zwischen der Stunde 9,0 und 10,5, zwei unmittelbar nebeneinander liegenden Zeitpunkten, kann ebenfalls ein signifikanter Anstieg von 6,4 auf 23,3 registriert werden. Die Anzahl der GGT⁺ foci pro cm² Gesamtfläche in Tieren ohne PH und HU-Synchronisation liegt mit 64,8 signifikant höher als bei teilhepatektomierten Tieren.

Um zu untersuchen, ob dieser Kurvenverlauf GGT-spezifisch ist, wurden die gleichen Parameter wie in Abb. 12 für ATPase-Defektbezirke bestimmt (Tabelle 8; Abb. 13). Aufgrund der großen Streuung der Einzelergebnisse sowohl in der regenerierenden Leber als auch in basal proliferierendem Gewebe kann der Kurvenverlauf nicht beurteilt werden. Der einzige signifikante Unterschied bei der regenerierenden Rattenleber liegt zwischen 9,0 und 10,5 Stunden, wo ein Anstieg der Anzahl der ATPase-Defektbezirke pro Gesamtfläche von 7,8 auf 16,2 festgestellt werden kann.

1.2.4. Proliferationskinetik in Abhängigkeit von der Größe der Enzymaberrationsbezirke

In den folgenden Scatterdiagrammen (Abb. 14-17) wurde untersucht, ob sich die Proliferationskinetik in GGT⁺ foci in Abhängigkeit von der Größe ändert. Randständige Bezirke, deren Fläche nur zum Teil angeschnitten wurde, wurden nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse der Versuchsgruppe A setzen sich aus jeweils 2 Zeitabschnitten nach HU-Block zusammen: 1,5 und 3,0 Stunden (Abb. 14), 4,5 und 6,0 Stunden (Abb. 15) und 9,0 und 10,5 Stunden (Abb. 16). Für die Tiere der Versuchsgruppe C (basale Proliferation) wurde ein eigenes Scatterdiagramm erstellt (Abb. 17).

MI %

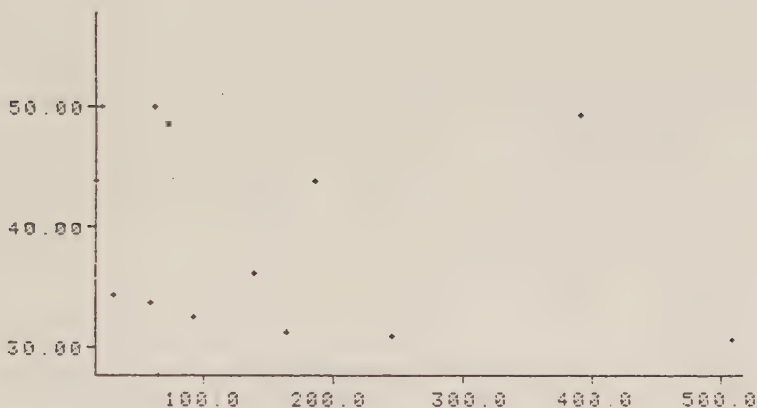


Gesamtzellzahl

Abb. 14: Korrelation zwischen ³H-TdR-MI und Größe der GGT⁺ foci, 1,5 und 3,0 h nach dem Ende des HU-Blocks.

GGT⁺ foci mit einer geringen Zellzahl (bis 350 Zellen) zeigen zwischen 1,5 und 3,0 Stunden nach HU-Block (Abb. 14) ein sehr unterschiedliches Proliferationsverhalten. Die MI liegen etwa zwischen 1% und 60%; größere foci (über 350 Zellen) zeigen einen niedrigeren MI. Er liegt etwa zwischen 1% und 25%.

MI %

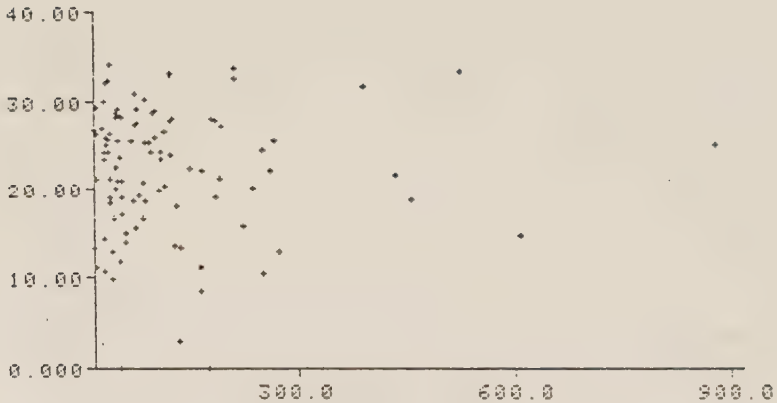


Gesamtzellzahl

Abb. 15: Korrelation zwischen ^3H -TdR-MI und Größe der GGT⁺ foci, 4,5 und 6,0 h nach dem Ende des HU-Blocks.

Zwischen 4,5 und 6,0 Stunden nach HU-Block (Abb. 15) liegt der MI mit maximal 50% niedriger als zu früheren Zeitpunkten. Es finden sich hier nur wenige große GGT⁺ foci. Kleinere zeigen auch hier einen sehr uneinheitlichen MI zwischen 30% und 50%.

MI %



Gesamtzellzahl

Abb. 16: Korrelation zwischen ^3H -TdR-MI und Größe der GGT $^+$ foci, 9,0 und 10,5 h nach dem Ende des HU-Blocks.

Zum Zeitpunkt 9,0 und 10,5 Stunden nach HU-Block (Abb. 16) finden sich viele kleine GGT $^+$ foci mit sehr unterschiedlichem MI. Er liegt im Mittel zwischen 10 und 30%. Große foci (über 400 Zellen) zeigen einen höheren MI.

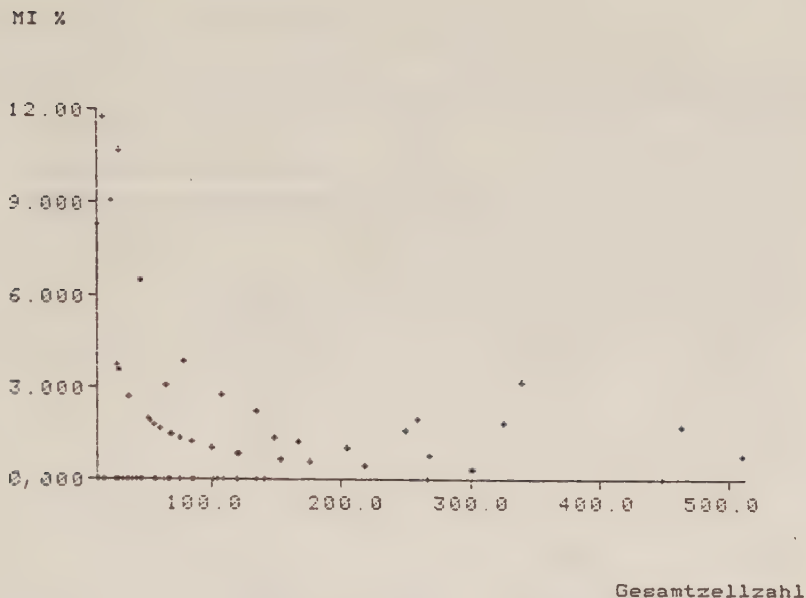


Abb. 17: Korrelation zwischen ^3H -TdR-MI und Größe der GGT $^+$ foci in basal proliferierendem Lebergewebe ohne partielle Hepatektomie und HU-Behandlung.

Für basal proliferierendes Lebergewebe (Abb. 17), ohne Synchronisation des Zellzyklus, ergeben sich MI mit einem Maximum von etwa 12%, i.e. unter den Werten für die regenerierende Leber. Mit zunehmender Größe der GGT $^+$ foci nimmt der MI zunächst bis zu einer Zellzahl von etwa 150 Zellen ab, zeigt jedoch in größeren Bezirken ein unregelmäßiges Bild.

2. ^3H -Thymidin-Dauermarkierung

2.1. Tabellarische und graphische Zusammenfassung

Unmittelbar nach der partiellen Hepatektomie wurden den Tieren der Versuchsgruppe B zur ^3H -TdR-Dauermarkierung osmotische Minipumpen für 12, 24, 48 und 72 Stunden implantiert. Tabelle 9 zeigt die Einzelergebnisse der Auswertung der GGT-Präparate, aufgeführt für die verschiedenen Zeitabschnitte, für jedes Tier und nach Leberlappen (Ld = Lob. dext., Lc = Lob. caud.) getrennt.

Tabelle 9:

^3H -TdR Dauermark. (h)		Mi Normal- gewebe (%)	Anzahl EAB	Gesamtzellzahl in allen EAB	^3H -TdR MI EAB (%)
Tier/Leber- lappen					
12.0 h					
1	Ld	0,1	0	n. b.	n. b.
	Lc	0,9	0	n. b.	n. b.
2	Ld	0,1	0	n. b.	n. b.
	Lc	0,1	0	n. b.	n. b.
3	Ld	0,1	0	n. b.	n. b.
	Lc	0,1	1	281	6,1

n. b. = nicht bestimmbar

Tabelle 9: Fortsetzung

³ H-TdR Dauermark. (h)		Mi Normal- gewebe (%)	Anzahl EAB	Gesamtzellzahl in allen EAB	³ H-TdR MI EAB (%)
Tier/Leber- lappen					
24,0 h					
4	Ld	8,2	8	1357	10,9
	Lc	16,6	0	n.b.	n.b.
5	Ld	15,1	8	850	22,6
	Lc	23,3	3	424	42,5
6	Ld	2,7	14	956	4,0
	Lc	5,2	17	850	7,4
48,0 h					
7	Ld	60,3	15	1443	68,2
	Lc	60,4	7	970	70,7
8	Ld	55,5	3	292	67,1
	Lc	51,7	10	289	66,1
9	Ld	56,0	12	921	61,8
	Lc	58,5	5	312	68,0
72,0 h					
10	Ld	72,5	22	1804	73,1
	Lc	79,9	11	1383	77,4
11	Ld	76,5	2	151	80,1
	Lc	71,9	1	n.b.	n.b.
12	Ld	71,2	35	3028	73,7
	Lc	53,5	24	575	55,1

n.b. = nicht bestimmbar

Tabelle 9 zeigt den $^3\text{H-TdR-MI}$ der GGT $^+$ foci in %, errechnet aus der Summe der markierten Hepatozyten aller Bezirke eines Leberlappens, im Verhältnis zur Gesamtzellzahl aller foci. Der MI des Normalgewebes wurde randomisiert aus 2000 Hepatozyten ermittelt (siehe Material und Methoden).

Bei einigen Tieren waren keine GGT $^+$ Bezirke nachweisbar, so daß der MI hier nicht errechnet werden konnte. Für die Ergebnisberechnung zu den verschiedenen Zeitabschnitten standen diese Tiere nicht zur Verfügung.

Bei der Beurteilung der MI in den GGT $^+$ foci zu den einzelnen Zeitpunkten ist zu beachten, daß die Anzahl der foci mit einem Minimum von 1 Bezirk und einem Maximum von 35 Bezirken, sowie die Gesamtzellzahl aller GGT $^+$ foci mit einem Minimum von 151 und einem Maximum von 3028 pro Leberlappen stark schwanken. Daher ist die statistische Aussagekraft sehr unterschiedlich.

Eine Gesetzmäßigkeit in der unterschiedlichen Verteilung der MI in den einzelnen Leberlappen ist, wie auch die Ergebnisse der $^3\text{H-TdR-Pulsmarkierung}$ zeigen, nicht zu ermitteln.

Bei der $^3\text{H-TdR-Dauermarkierung}$ wurden bei der mikroskopischen Auswertung markierte und unmarkierte GGT $^+$ Einzelzellen notiert (Tabelle 10). Die Ergebnisse zeigen eine große Streuung, eine Beurteilung kann daher nicht vorgenommen werden. Dies stimmt mit den Resultaten der Pulsmarkierung überein.

Tabelle 10: Auswertung der GGT+ Einzelzellen

-----				-----			
³ H-TdR		einzelne GGT*		h nach		einzelne GGT*	
Dauermark.		Zellen		HU		Zellen	
(h)							
Tier/Leber-		mark.	unmark.	Tier/Leber-		mark.	unmark.
lappen		-----		lappen		-----	
12,0 h				48,0 h			
1	Ld	0	0	7	Ld	3	2
	Lc	0	0		Lc	3	1
2	Ld	0	0	8	Ld	0	0
	Lc	0	0		Lc	1	0
3	Ld	0	0	9	Ld	2	1
	Lc	0	0		Lc	0	0
-----				-----			
24,0 h				72,0 h			
4	Ld	0	3	10	Ld	6	5
	Lc	0	0		Lc	5	2
5	Ld	0	6	11	Ld	0	0
	Lc	0	0		Lc	0	0
6	Ld	0	0	12	Ld	5	3
	Lc	2	12		Lc	3	4
-----				-----			

In den folgenden Tabellen 11-13 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Für jede Zeitspanne der Dauermarkierung setzen sie sich zusammen aus der Summe der Einzelwerte beider Leberlappen für jeweils 3 Tiere. Abweichungen in der Zahl der Einzelwerte gehen aus Tabelle 9 hervor.

³ H-TdR Dauermark. (h)	MI Normalgewebe Mittelwert (%)	³ H-TdR-MI EAB Mittelwert (%)
12	0,2 ± 0,3	6,1 ± n.b.
24	11,8 ± 7,8	14,0 ± 15,6
48	57,1 ± 3,3	67,1 ± 3,0
72	70,9 ± 9,2	72,8 ± 9,8

Tabelle 11: MI (%) für Normalgewebe und GGT⁺ foci, nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. Der MI zum Zeitpunkt 12 h entspricht nur einem Wert. Mittelwert ± Standardabweichung.

³ H-TdR Dauermark. (h)	mm ² EAB x 100 ----- cm ² Gesamtfläche
24	44,3 ± 33,1
48	44,6 ± 19,6
72	141,1 ± 148,0

Tabelle 12: Fläche der GGT⁺ foci in mm² x 100 pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. Bei 12 h Dauermarkierung war für die Auswertung nur ein Rand-EAB vorhanden, dieser wurde zur Berechnung der relativen EAB-Fläche nicht verwendet. Mittelwert ± Standardabweichung.

³ H-TdR Dauermark. (h)	Anzahl EAB ----- cm ² Gesamtfläche
12	0,2 ± 0,5
24	9,5 ± 8,2
48	18,8 ± 14,8
72	44,1 ± 41,4

Tabelle 13: Anzahl der GGT⁺ foci pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. Mittelwert ± Standardabweichung.

MI %

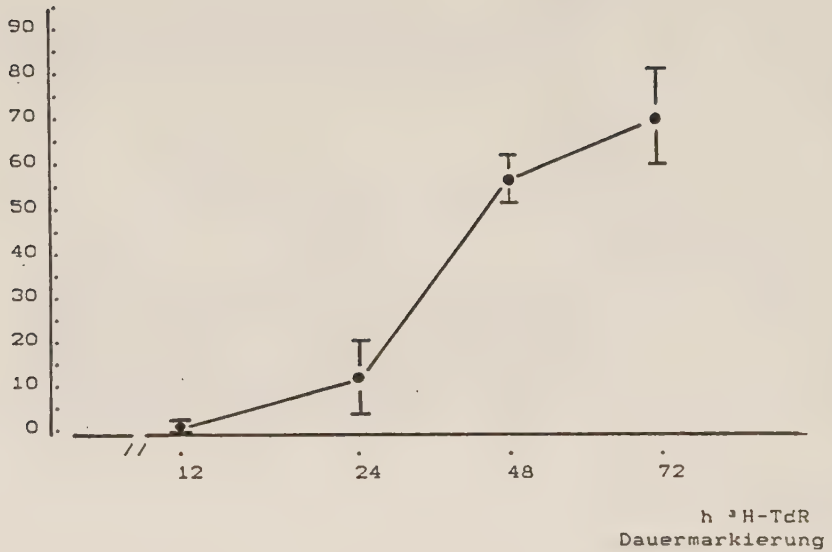


Abb. 18: MI (%) im Normalgewebe nach verschiedenen Expositionszeiten mit $^3\text{H-TdR}$. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

MI %

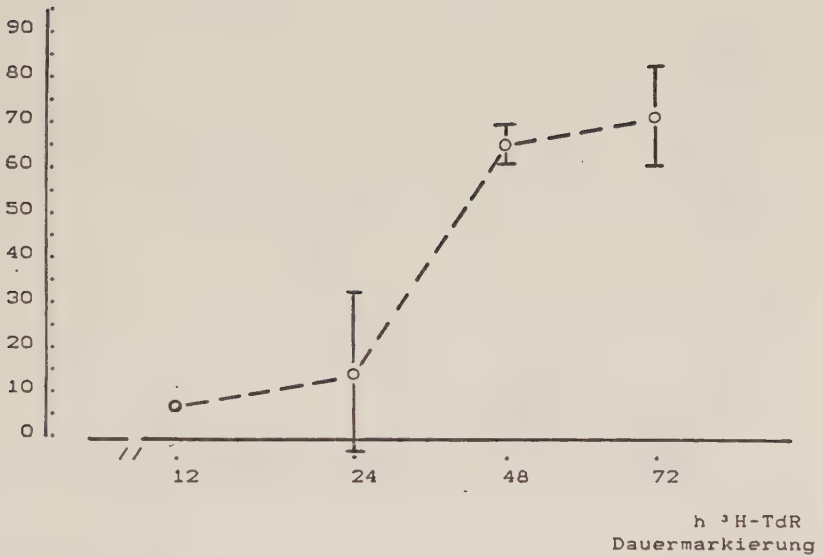


Abb. 19: MI (%) in GGT⁺ foci nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. Für 12 h Dauermarkierung konnte keine Standardabweichung berechnet werden, da hier nur ein Versuchsergebnis vorlag (vgl. Tabelle 9). Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

MI %

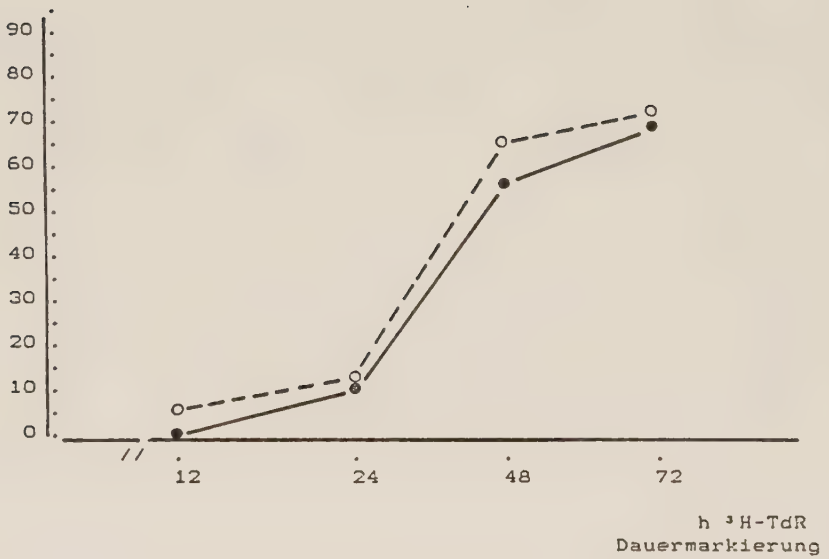


Abb. 20: Vergleich der Abb. 18 und 19. MI (%) für Normalgewebe (● — ●) und für GST⁺ foci (○ --- ○) nach verschiedenen Expositionszeiten mit ^3H -TdR.

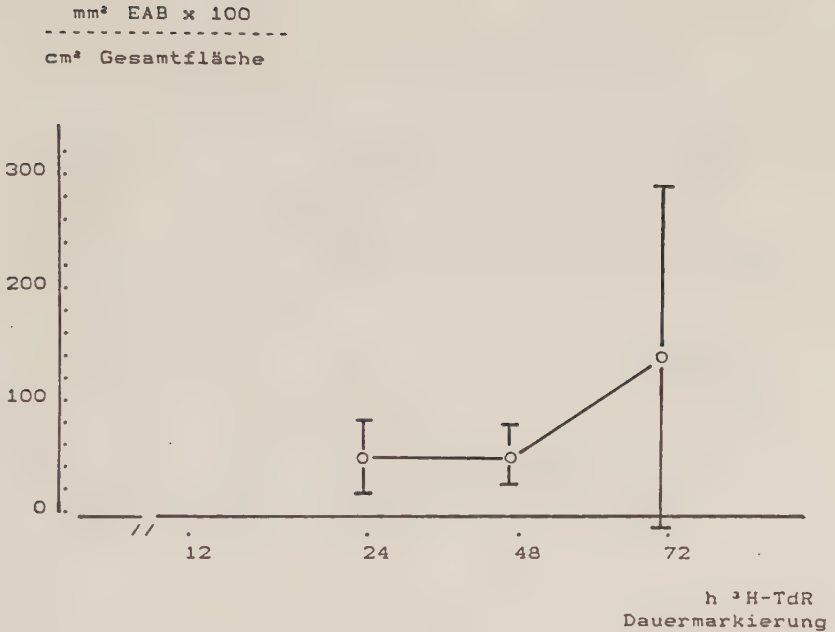


Abb. 21: Fläche der GGT⁺ foci in mm² x 100 pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

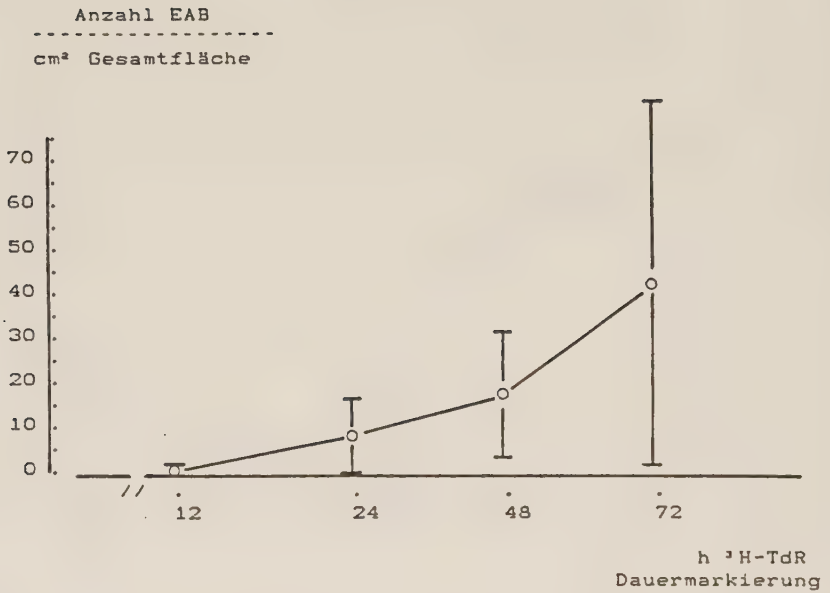


Abb. 22: Anzahl der GGT⁺ foci pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

2.2. Erläuterung der Ergebnisse zur ^3H -TdR-Dauermarkierung

2.2.1. Wachstumsfraktion im Normalgewebe und in Enzymaberrationsbezirken

Nach einer ^3H -TdR-Dauermarkierung zeigt der MI die Wachstumsfraktion an, i.e. den Gesamtanteil der in die DNA-Synthese eintretenden Zellen. Im Normalgewebe (Tabelle 11, Abb. 18) nimmt der MI von 0,2% nach 12 Stunden bis auf 70,9% nach 72 Stunden kontinuierlich zu.

Der MI in den GGT⁺ foci (Tabelle 11, Abb. 19) liegt nach 12 Stunden Dauermarkierung bei 6,1%, steigt mit einer Verzögerung zwischen 12 und 24 Stunden nach 72 Stunden bis auf 72,8% an. Zwischen 48 und 72 Stunden nimmt der MI nur noch in geringem Maß zu, ein Plateau wird nicht erreicht.

Vergleicht man beide Kurven (Abb. 20), so fällt auf, daß nach 12 Stunden ^3H -TdR-Exposition der MI im Normalgewebe mit 0,2% unter dem Niveau der GGT⁺ foci mit 6,1% liegt. Da jedoch zu diesem Zeitpunkt für die Bestimmung des MI in den foci nur ein Wert vorhanden war, konnte der U-Test nicht durchgeführt werden. Im weiteren Verlauf sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

2.2.2. Flächenanteil der Enzymaberrationsbezirke an der Gesamtfläche

Bei der relativen EAB-Fläche (Tabelle 12, Abb. 21) traten nach 12 Stunden Dauermarkierung nur Rand-EAB auf. Die Ergebnisse für die unterschiedlichen Zeitspannen zeigen eine große Streuung, signifikante Unterschiede traten nicht auf.

2.2.3. Numerische Dichte der Enzymaberrationsbezirke

Die Anzahl der GGT* foci pro Gesamtfläche (Tabelle 13, Abb. 22) zeigt ebenfalls eine große Streuung; zwischen 12 und 24 Stunden Dauermarkierung erfolgt ein signifikanter Anstieg von 0,2 EAB auf 9,5 EAB.

3. Veränderungen des Körpergewichts DENA-behandelter und nicht DENA-behandelter Versuchstiere

In der Tabelle 14 und Abb. 23 sind die wöchentlich bestimmten Tiergewichte bis 91 Tage nach Beginn der PB-Diät dargestellt. Die DENA-behandelten Versuchstiere und die Kontrollgruppe, ohne DENA-Injektionen, wurden unter denselben Versuchsbedingungen gehalten. Die mittleren Gewichte errechnen sich aus jeweils 5 Tieren der DENA-Gruppe und jeweils 12 Tieren der Kontrollgruppe ohne DENA-Applikation.

Vier Wochen nach Versuchsbeginn, unmittelbar nach der letzten DENA-Injektion, ergibt sich eine signifikante Erniedrigung der Gewichte der DENA-Tiere mit 203g gegenüber 219g bei der Kontrollgruppe. Nach dem Ende der Injektionsserie zeigen die DENA-Tiere 14, 16, und 17 Wochen nach Versuchsbeginn signifikant erniedrigte Werte.

Wochen nach Versuchsbeginn	+ DENA Tiergewicht (g)	- DENA Tiergewicht (g)
0	103 ± 3	105 ± 4
1	126 ± 10	130 ± 8
2	154 ± 11	157 ± 9
3	181 ± 14	187 ± 13
4	203 ± 15	219 ± 21
5	232 ± 34	238 ± 22
6	244 ± 18	256 ± 30
7	262 ± 19	267 ± 29
8	272 ± 19	281 ± 26
9	282 ± 20	292 ± 31
10	288 ± 21	305 ± 31
11	292 ± 20	308 ± 28
12	297 ± 19	319 ± 33
13	302 ± 20	325 ± 31
14	303 ± 21	329 ± 27
15	307 ± 23	334 ± 26
16	310 ± 22	338 ± 30
17	314 ± 22	350 ± 31

Tabelle 14: Tiergewichte in g KG zu verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn. Mit DENA-Injektionen und ohne DENA-Injektionen. Mittelwert ± Standardabweichung.

Tiergewicht g

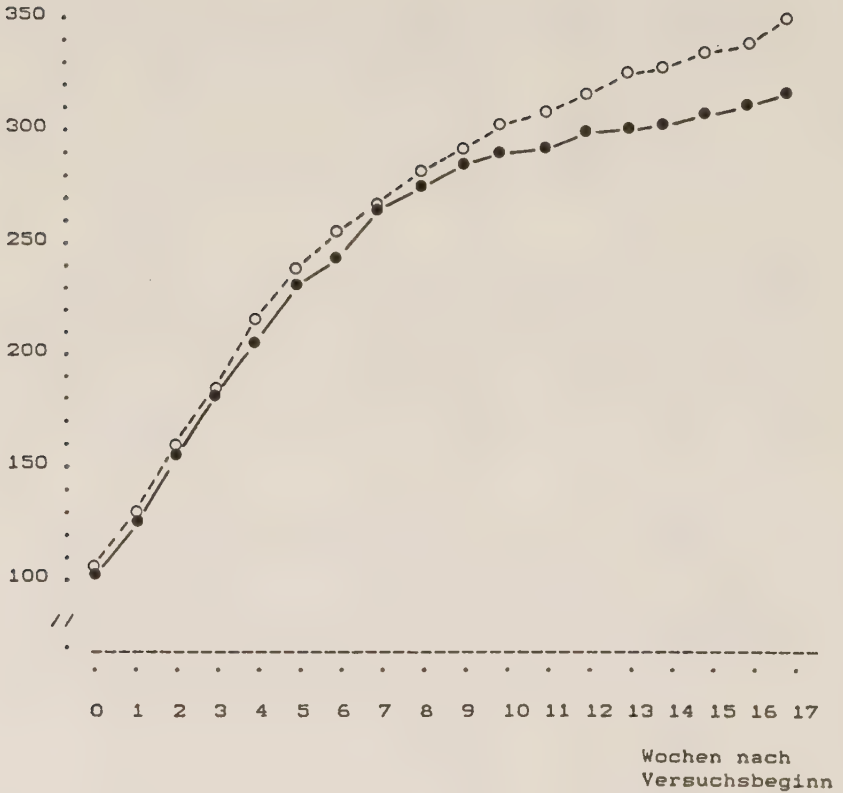


Abb. 23: Mittlere Tiergewichte in g KG zu verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn. Mit DENA-Injektionen (● — ●) und ohne DENA-Injektionen (○ --- ○).

D. Diskussion der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Änderungen in der homöostatischen Kontrolle der Zellproliferation in enzym-aberranten Arealen, die als praeneoplastische Populationen gelten (Rabes et al., 1972b; Scherer und Emmelot, 1976; Pitot et al., 1978; Pugh und Goldfarb, 1978), unter dem Einfluß des Promotors Phenobarbital (PB) zu erfassen. Ausgegangen wurde von dem Modell der regenerierenden Rattenleber, deren Zellproliferation durch eine partielle Hepatektomie angeregt und durch eine 10stündige HU-Infusion synchronisiert wurde. Durch diese Teilsynchronisation war es möglich, eine quantitative Aussage über das Verhalten der Hepatozyten und eine Zuordnung der Ergebnisse zu spezifischen Zellzyklusphasen zu versuchen. Zum Vergleich mit dem Verhalten praeneoplastischer Leberzellen wurde die Proliferationsaktivität in unverändertem regenerierendem Normalgewebe und in ruhendem Lebergewebe unbehandelter Ratten untersucht. In einer zweiten Versuchsreihe wurde ohne HU-Synchronisation die Wachstumsfraktion in Enzymaberrationsbezirken (EAB) und im Normalgewebe verglichen.

Eine Voraussetzung für die Entstehung von praeneoplastischen Zellpopulationen in der Leber ist die Einwirkung eines Carcinogens auf den Organismus und die irreversible Veränderung der Hepatozyten auf molekularer Ebene. Die irreversible Veränderung kommt auch in der verzögerten Entwicklung der Versuchstiere zum Ausdruck. Unmittelbar nach dem Ende der letzten i.p. Injektion des Carcinogens DENA und 10, 12 und 13 Wochen später konnte eine signifikante Verringerung der mittleren Tiergewichte gegenüber einer DENA-unbehandelten Kontrollgruppe gezeigt werden.

1. Proliferationsverhalten der Hepatozyten im Normalgewebe und in EAB

In der ruhenden Leber ohne Teilhepatektomie und HU-Synchronisation ergab sich, daß Hepatozyten in den GGT⁺ foci eine signifikant höhere Proliferationsaktivität als im Normalgewebe aufwiesen; diese Proliferationssteigerung kann auf die Einwirkung von PB zurückgeführt werden (Schulte-Hermann et al., 1981, 1983a). Um den promovierenden Effekt dem PB besser zuordnen zu können, wurde eine i.p. Injektionsweise des Carcinogens gewählt. DENA, bereits nach 24 Stunden vollständig metabolisiert (Magee und Lee, 1964), führt hierdurch nicht zur Kumulation. Nach Beendigung der Injektionsserie ist eine promovierende Wirkung des Carcinogens auszuschließen.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde unmittelbar nach der PH, ohne Zellzyklussynchronisation, mit der ³H-TdR-Dauermarkierung begonnen. Der MI in GGT⁺ foci liegt nach 12 Stunden ³H-TdR-Dauermarkierung mit 6,1% über dem Niveau des Normalgewebes mit 0,2%. Da jedoch zu diesem Zeitpunkt nur ein EAB-Wert vorliegt, konnte der U-Test nicht durchgeführt werden. Die Hepatozyten treten frühestens 14-15 Stunden nach der PH in die Synthesephase ein (Rabes und Tucek, 1970). 12 Stunden nach der Teilresektion könnte auch hier der erhöhte MI in den GGT⁺ foci den Proliferationsvorteil dieser Zellen gegenüber dem Normalgewebe widerspiegeln.

Eine partielle Hepatektomie (PH) führt sowohl im Normalgewebe als auch in EAB zu einer Erhöhung der Zellproliferation gegenüber ruhendem Lebergewebe nicht teilhepatektomierter Ratten. Das Maximum des MI der regenerierenden Normalleber

von Ratten, die weder mit einem Carcinogen noch mit PB behandelt wurden, liegt nach einer 10stündigen HU-Infusion etwa zwischen 40 und 60% (Rabes et al., 1977, 1986).

Das Maximum des Anteils der DNA-synthetisierenden Zellen an der Gesamtzellzahl im Normalgewebe und in den GGT⁺ foci nach der ³H-TdR-Pulsmarkierung liegt in vorliegender Arbeit mit 42,0% in der gleichen Größenordnung wie im Lebergewebe partiell hepatektomierter, aber nicht carcinogen-exponierter Ratten.

Der MI in den GGT⁺ foci erreicht 4,5 Stunden nach dem Ende des HU-Blocks ein Maximum und fällt anschließend ab, um zum Zeitpunkt 12,0 Stunden bis 27,3% wieder anzusteigen. Vergleicht man den Kurvenverlauf des MI der GGT⁺ Bezirke mit dem des Normalgewebes der regenerierenden Rattenleber, so kann, bis auf die Ergebnisse unmittelbar nach dem Absetzen der Zellzyklusblockade, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Der MI in GGT⁺ foci liegt nach 24 Stunden ³H-TdR-Dauermarkierung bei 14,0%. Hier und im weiteren Kurvenverlauf konnten keine signifikanten Unterschiede in GGT⁺ foci und im Normalgewebe gefunden werden. Der MI in den foci steigt 48 Stunden nach der PH bis auf 67,1%. Bis 72 Stunden erfolgt nur noch eine geringe Zunahme des MI. Im Vergleich zur ³H-TdR-Pulsmarkierung zeigt sich auch hier die Reaktionsbereitschaft der Hepatozyten in GGT⁺ foci und im Normalgewebe, auf einen Wachstumsimpuls mit einer Erhöhung der Zellproliferation zu antworten.

Nach HU-Infusionsende beginnt während der S-Phase der Einbau des ^3H -TdR in die DNA (Iseler, 1977). Bei einer ausreichenden Zellzyklusblockade durch HU (Rabes et al., 1986) ist der nach Beendigung der HU-Infusion bestimmte MI in den GGT $^+$ Bezirken mit 9,9% unmittelbar nach dem Absetzen des HU relativ hoch. Dieser Befund könnte durch eine Resistenz der praeneoplastisch veränderten Hepatozyten gegenüber HU erklärt werden. Eine Resistenz praeneoplastischer Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Carcinogenen als Erklärung des Wachstumsvorteils der Hepatozyten in EAB wurde diskutiert (Farber, 1980; Pitot und Sirica, 1980; Emmelot und Scherer, 1980; Barbason und Betz, 1981b).

Bei der Betrachtung der Absolutwerte muß einschränkend angemerkt werden, daß der MI zu frühen Zeitpunkten nach der HU-Infusion durch eine Änderung der Poolgröße der Desoxyribonukleosidtriphosphate verändert sein kann (Walters et al., 1973; Plagemann und Erbe, 1974). Exakte Angaben hierüber liegen für die regenerierende Rattenleber nicht vor.

Für die selektive Proliferationssteigerung in den GGT $^+$ foci gegenüber dem Normalgewebe in der nicht stimulierten Leber, den erhöhten MI in EAB gegenüber dem Normalgewebe unmittelbar nach dem Absetzen der Zellzyklusblockade und den fehlenden Unterschied in der Proliferationsaktivität der GGT $^+$ foci bzw. des umgebenden Normalgewebes gegenüber unbehandeltem Normalgewebe lassen sich folgende Interpretationen diskutieren: Nach 20 i.p. DENA Injektionen mit einer Dosis von 8 mg/kg KG und anschließender 91tägiger PB-Diät (0,05%) kommt es zu einer Ausbildung von GGT $^+$ Enzymaberrationsbezirken. Diese befinden sich, bei den verwendeten Dosierungen, in einem frühen Entwicklungsstadium, in dem PB die

Proliferationsaktivität selektiv erhöht, aber die homöostatische Kontrolle der Zellteilung noch weitgehend uneinflusst ist (Rabes et al., 1970; Barbason et al., 1983).

Der relativ steile Abfall des MI zwischen 4,5 und 7,5 Stunden nach HU spricht dafür, daß sowohl in der regenerierenden Normalleber als auch in GGT⁺ foci die Zellproliferation mit erhöhter Synchronie abläuft.

In der regenerierenden, nicht durch HU synchronisierten Rattenleber durchlaufen die Hepatozyten die Synthesephase mit einer mittleren Dauer von $t_s = 7,6$ Stunden (Rabes et al., 1972a; 1976). Aufgrund der mittleren t_s von 7,6 Stunden und einer mittleren totalen Zellzyklusdauer von $t_c = 33$ Stunden kann der Wiederanstieg des MI bis zum Zeitpunkt 12,0 Stunden nicht mit einem erneuten Eintreten dieser Hepatozyten in eine zweite DNA-Synthesephase erklärt werden. Nach HU kommt es bei verschiedenen Zell-Linien in vitro zu einer Verkürzung der DNA-Synthesedauer (Pfeiffer und Tolmach, 1967; Rajewsky, 1970; Rajewsky et al., 1971; Rabes, 1977). Dies führt zwar zu einer Beschleunigung des Zellzyklus, reicht aber sicher nicht aus, um das Wiederansteigen des MI nach der ersten DNA-Synthesewelle zu erklären. Der zweite "Peak" kann nicht auf das verspätete Eintreten non-parenchymaler Zellen (Rabes et al., 1975) zurückgeführt werden, da in vorliegenden autoradiographischen Versuchen zur Bestimmung des MI nur Hepatozyten ausgezählt wurden.

Ursache für den Wiederanstieg des MI könnte eine Proliferationswelle von Hepatozyten in der perivenösen Zone III sein, die verspätet in die S-Phase eintreten (Rabes et al., 1976). Zum Zeitpunkt des zweiten Anstiegs, 12 Stunden nach

HU, haben die Hepatozyten der Periportal- und Intermediärzone die Replikation durchlaufen und befinden sich bereits in der G₂- und M-Phase (Rabes et al., 1986).

Bei der ³H-TdR-Dauermarkierung kommt es nur noch zu einer geringen Zunahme des MI nach 48 und 72 Stunden, ein Plateau wird jedoch nicht erreicht. Dies könnte darin begründet liegen, daß 48 Stunden nach PH eine zweite Proliferationswelle ausgehend von der Periportalzone I die DNA-Synthese beginnt und anschließend die Mitosephase durchläuft (Rabes, 1976). Zusätzlich starten die letzten Zellen der ersten Proliferationswelle 40 Stunden nach der Teilresektion in der perivenösen Zone III mit der DNA-Synthese (Rabes und Tuczek, 1970; Rabes, 1976) und durchlaufen anschließend die Mitosephase.

Es ergeben sich aus den vorliegenden Resultaten keine Hinweise für eine unterschiedliche Dauer der S-Phase in GGT⁺ foci und im Normalgewebe. Der fehlende Unterschied des Verhaltens der Hepatozyten in den GGT⁺ Bezirken und im Normalgewebe bei Betrachtung der Vorgänge während der verschiedenen Zellzyklusphasen bestätigt, daß in diesem Entwicklungsstadium der Carcinogenese eine übergeordnete homöostatische Kontrolle dieser Abläufe noch vorhanden ist.

2. Bestimmung der relativen Anzahl und Größe der EAB

Die Anzahl und die Größe der GGT⁺ foci nimmt mit der Dauer der DENA-Fütterung kontinuierlich zu. Später stellt sich ein diskontinuierliches Verhalten in Bezug auf Größenwachstum und numerischer Dichte ein (Rabes et al., 1972b).

Aus dieser Erkenntnis heraus wurde die Anzahl der GGT⁺ foci

pro Gesamtfläche, die relative EAB-Fläche und das Verhältnis des MI zu der Größe der dazugehörigen foci bestimmt.

Unmittelbar nach dem Ende des HU-Blocks wurden 28,0 GGT⁺ foci pro cm² Gesamtfläche gezählt. Die Anzahl nimmt zur Stunde 6,0 bis auf 2,5 foci pro Flächeneinheit signifikant ab, um ebenfalls wieder signifikant bis auf ein Maximum von 23,3 zur Stunde 10,5 anzusteigen. Dieser Kurvenverlauf war zunächst nicht zu erwarten, da sich die relative Anzahl der GGT⁺ foci (bezogen auf die Gesamtfläche) innerhalb eines so kurzen Zeitraumes von 6,0 Stunden nicht vermindert und anschließend innerhalb 4,5 Stunden etwa bis auf das Ausgangsniveau wieder ansteigen kann. Es stellt sich die Frage, ob dieser Kurvenverlauf GGT-spezifisch ist. Um die Spezifität zu klären, wurde die relative Anzahl der EAB auch in ATPase-Präparaten ausgewertet. Die Einzelergebnisse für die Bestimmung der ATPase-Defektbezirke zeigen eine große Streuung. Lediglich zwischen 9,0 und 10,5 Stunden kann ein signifikanter Anstieg der Dichte der ATPase-Defektbezirke beobachtet werden. Diese eine signifikante Differenz läßt jedoch den Schluß auf eine veränderte numerische Dichte der ATPase-Defektbezirke während der S-Phase nicht zu.

Als Ursache für die verminderte Anzahl der GGT⁺ Bezirke könnte ein Abfall der GGT-Produktion während der Synthesephase sein, so daß hierdurch kleine bzw. schwach GGT⁺ foci dem Nachweis entgehen. Eine verkürzte DNA-Synthese nach HU-Block (Pfeiffer und Tolmach, 1976; Rajewsky, 1970; Rajewsky et al., 1971; Rabes, 1977) könnte metabolische Veränderungen bewirken, die möglicherweise auch die Expression der GGT beeinflusst. Ein denkbarer Mechanismus wäre, daß vom Beginn der DNA-Synthese an weniger m-RNA für GGT gebildet wird und

infolgedessen sich die GGT-Proteinsynthese reduziert. Voraussetzung für die Richtigkeit dieser Annahme wäre eine kurze biologische Halbwertszeit für die GGT-m-RNA sowie der GGT selbst. Angaben hierfür konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Für die Richtigkeit dieser Hypothese spricht der hohe Wert von 64,8 GGT⁺ foci pro cm² Gesamtfläche für die ruhende Leber ohne partielle Hepatektomie und HU. Während sämtlicher Zeitpunkte ergeben sich signifikante Reduktionen der Zahl der GGT⁺ Bezirke in der regenerierenden Leber. Da bei dieser Versuchsgruppe die Proliferation nicht durch eine PH stimuliert wurde, ist der Anteil DNA-synthetisierender Hepatozyten im Vergleich zum regenerierenden Lebergewebe relativ klein. Eine Beeinflussung der Expression der GGT würde nach der genannten Hypothese nicht eintreten, die "Anzahl" der EAB bleibt hier konstant hoch.

Für den Flächenanteil der GGT⁺ foci an der Gesamtfläche ergibt sich: Von der Stunde 9,0 bis 10,5 nach partieller Hepatektomie steigt der relative Flächenanteil der GGT⁺ foci signifikant an und zwischen 10,5 und 12,0 Stunden fällt er, ebenfalls signifikant, wieder ab. Dagegen fand sich eine signifikante Erhöhung der relativen EAB-Fläche des ruhenden Lebergewebes gegenüber der regenerierenden Leber zu den Zeitpunkten 4,5 bis 9,0 und 12,0 Stunden.

Die Ergebnisse zeigen eine große Streuung, die naturgemäß zum Teil durch die Beschränkung der Tierzahlen begründet ist. Viele EAB waren sehr unregelmäßig und schwach GGT⁺, so daß die Abgrenzung zum übrigen Lebergewebe in einigen Präparaten nicht möglich war. Sie wurden daher nicht in die Auswertung einbezogen. Eine ähnliche Schwierigkeit wurde schon für ATPase-Färbungen beschrieben. Als Ursache wurde die

Fütterung von PB bis zum Tode der Versuchstiere angenommen. Absetzen von PB 10 Tage vor dem Tötungszeitpunkt verbesserte die Auswertbarkeit der ATPase-Defektbezirke (Rink, 1985), doch darf nicht unberücksichtigt bleiben, daß unter Stop-Bedingungen auch Reversionen des Enzymdefektmusters auftreten können (Hendrich et al., 1986). Eine gleichzeitig durchgeführte Untersuchung mit dem gleichen Versuchsansatz wie in der vorliegenden Arbeit, jedoch ohne PB-Fütterung (Galm, 1987), bestätigt diese Beeinflussung der EAB-Nachweisbarkeit für GGT-Färbungen. Ohne PB sind diese EAB wesentlich besser und schärfer vom umliegenden Lebergewebe abgrenzbar.

Der signifikante Anstieg der relativen EAB-Fläche zwischen 9,0 und 10,5 Stunden und die signifikant erhöhten Werte im ruhendem Lebergewebe gegenüber der regenerierenden Leber könnten ebenfalls als Ausdruck einer verminderten GGT-Produktion während der Synthesephase zu denken sein.

Auch für die ^3H -TdR-Dauermarkierung wurden sowohl die relativen Flächen der GGT $^{+}$ EAB als auch die Anzahl der GGT $^{+}$ foci pro Gesamtfläche berechnet. Lediglich bei der Anzahl der GGT $^{+}$ foci pro Gesamtfläche konnte eine signifikante Zunahme zwischen 12 und 24 Stunden beobachtet werden. Dieser Einzelwert läßt jedoch keine zuverlässige Aussage über die Kurvenverläufe zu. Eine Vergrößerung der relativen EAB-Fläche ist innerhalb eines so kurzen Versuchszeitraums nicht zu erwarten.

In der Literatur gibt es verschiedene Aussagen über ein differierendes Proliferationsverhalten in großen und kleinen EAB, abhängig von der Dauer der Carcinogenapplikation und

Exposition gegenüber einem Promotor (Pugh und Goldfarb, 1978; Schulte-Hermann et al., 1981).

In dieser Arbeit wurde der MI zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der partiellen Hepatektomie für große und kleine EAB ermittelt und mit den Ergebnissen ruhenden Lebergewebes verglichen. Bei der Betrachtung der Scatterdiagramme fällt zunächst die große Zahl der GGT⁺ foci mit einer Zellzahl < 300 auf, große EAB finden sich relativ selten. Dies bedeutet, daß nach 20 Einzeldosen DENA (8 mg/kg KG) und 91 Tage PB (0,05%) sich bis zu diesem Zeitpunkt viele kleine und nur wenige große GGT⁺ foci entwickelt haben. Daraus ergibt sich das Problem, daß bei EAB mit einer geringen Zellzahl die Ergebnisse des MI eine breite Streuung zeigen. Erschwerend für die Auswertung kommt noch hinzu, daß sich, wie schon beschrieben, die numerische Dichte und Fläche der GGT⁺ Bezirke während der S-Phase vermindert. Die geringe Proliferation der EAB in der ruhenden Leber wird auch in den Scatterdiagrammen deutlich. Unter größtem Vorbehalt könnte eine Abnahme der Proliferation in größeren GGT⁺ foci angenommen werden, eine quantitative Aussage ist jedoch nicht möglich.

Während der Auswertung wurden markierte und unmarkierte GGT⁺ Hepatozyten außerhalb der GGT⁺-EAB notiert. Diese Zellen traten, vereinzelt oder gehäuft, unabhängig von den GGT⁺ enzymaberranten Bezirken auf. Eine Gesetzmäßigkeit in Bezug auf das Verteilungsmuster innerhalb eines Leberlappens und auf das Proliferationsverhalten konnten nicht gefunden werden. Das Vorhandensein von GGT⁺-markierten Hepatozyten unabhängig von praeneoplastischen foci wurde bereits für Sprague-Dawley- und Fischer-Ratten (Russell et al., 1987)

und für weibliche Wistar-Ratten (Schulte-Hermann et al., 1981), jedoch noch nicht für die in diesem Versuch verwendeten männlichen Wistar-Ratten (Wistar/Han) beschrieben. Russell et al. (1987) fanden ein periportal gehäuftes Auftreten von den GGT⁺ Zellen, unabhängig von einer PB-Fütterung. Sie traten vermehrt auf in Ratten, die unge-reinigtes gegenüber gereinigtem Futter bekamen; auch war ein vermehrtes Auftreten in Fischer- im Vergleich zu Sprague-Dawley-Ratten zu beobachten. Diese einzeln liegenden GGT⁺ Zellen zeigten keine Erhöhung der DNA-Synthese auf mitogene Stoffe (Schulte-Hermann et al., 1981). Die nicht focal er-scheinende GGT unterscheidet sich immunhistochemisch von der focalen GGT (Fischer et al., 1986). Dies legt die Schluß-folgerung nahe, daß für die Expression der focalen und nichtfocalen GGT unterschiedliche Regulationsmechanismen verantwortlich sein könnten.

3. Vergleichende Diskussion

Parallel zu dieser Arbeit wurde eine zweite Dissertation (Galm, 1987) unter identischen Versuchsbedingungen ange-fertigt, jedoch ohne Phenobarbital-Exposition. Ein Ver-gleich mit den hier vorgelegten Ergebnissen erscheint sinnvoll. Die Übernahme der Zahlenwerte aus Galm (1987) erfolgt im Einverständnis mit dem Autor.

Die Ergebnisse von Phenobarbital-gefütterten (vorliegende Arbeit) und nicht Phenobarbital-exponierten (Galm, 1987) Versuchstieren sind in den folgenden Tabellen und Graphiken zusammengefaßt (Tabelle 15-17, Abb. 24-27).

Die Auswertung beider Versuche wurde unter gleichen Kriterien und nach denselben Methoden durchgeführt. Tabelle 15 zeigt die Mittelwerte der MI zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach HU, Tabelle 16 für die ^3H -TdR-Dauerinfusion.

h nach HU	MI Normalgewebe Mittelwert (%)	^3H -TdR-MI EAB Mittelwert (%)
0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ n.b.
1,5	9,7 $\pm$ 1,5	21,6 $\pm$ 5,1
3,0	24,9 $\pm$ 11,8	26,3 $\pm$ 19,7
4,5	34,8 $\pm$ 2,5	38,1 $\pm$ n.b.
6,0	15,0 $\pm$ 4,6	16,1 $\pm$ 4,2
7,5	16,7 $\pm$ 5,8	n.b. $\pm$ n.b.
9,0	15,7 $\pm$ 4,3	21,5 $\pm$ 0,1
10,5	19,6 $\pm$ 3,1	34,0 $\pm$ 7,3
12,0	19,4 $\pm$ 3,1	26,7 $\pm$ 4,6
Basale Proliferation	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,3

Tabelle 15: Gegenüberstellung des ^3H -TdR MI (%) im Normalgewebe und in den GGT⁺ foci zu verschiedenen Zeitabschnitten nach dem HU-Block und für die basale Proliferation (Werte aus Galm, 1987). Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

³ H-TdR Dauermark. (h)	MI Normalgewebe Mittelwert (%)	³ H-TdR-MI EAB Mittelwert (%)
12	0,2 ± 0,1	n.b. ± n.b.
24	22,2 ± 12,7	36,1 ± 9,0
48	62,5 ± 2,7	74,1 ± 3,7
72	72,4 ± 8,0	77,8 ± 9,0

Tabelle 16: MI (%) für Normalgewebe und GGT⁺ foci, nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. (Werte aus Galm, 1987). Mittelwert ± Standardabweichung.

Tabelle 17 zeigt die relative Anzahl der GGT⁺ foci für die Pulsmarkierung, in Tieren die nicht mit PB behandelt wurden.

h nach HU	Anzahl EAB
	cm ² Gesamtfläche
0,0	0,4 ± 0,9
1,5	2,5 ± 2,9
3,0	0,8 ± 0,9
4,5	0,9 ± 2,1
6,0	0,5 ± 0,7
7,5	0,0 ± 0,0
9,0	0,7 ± 0,7
10,5	3,5 ± 3,1
12,0	0,9 ± 0,8
Basale Proliferation	3,2 ± 2,1

Tabelle 17: Anzahl der GGT⁺ foci pro cm² ausgewerteter Gesamtfläche (Werte aus Galm, 1987). Mittelwert ± Standardabweichung.

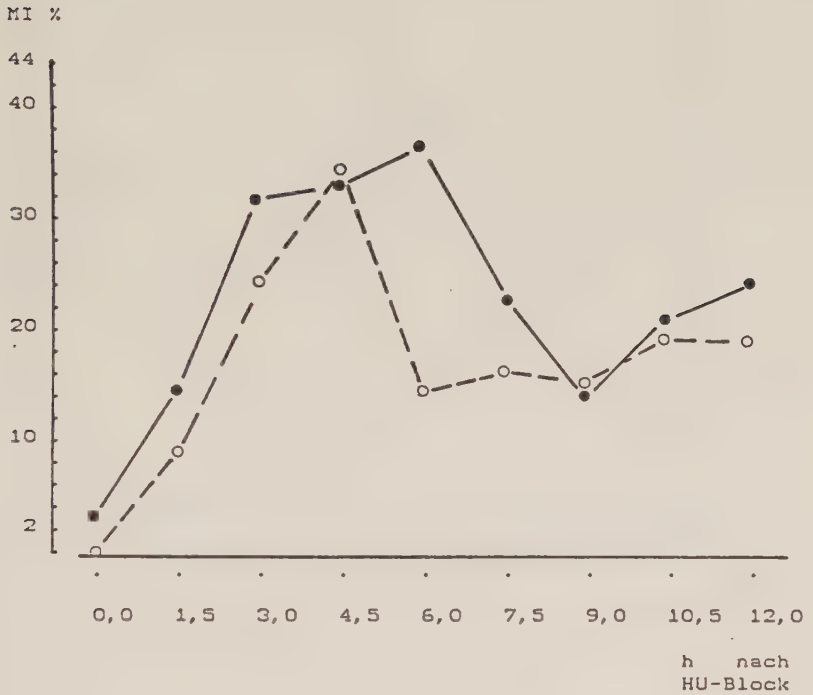


Abb. 24: Mittlerer ^3H -TdR-MI (%) zu verschiedenen Zeitabständen nach dem Ende des HU-Blocks. MI im Normalgewebe jeweils mit PB (● — ●) und ohne PB (○ --- ○) (Werte ohne PB-Fütterung aus Galm, 1987).

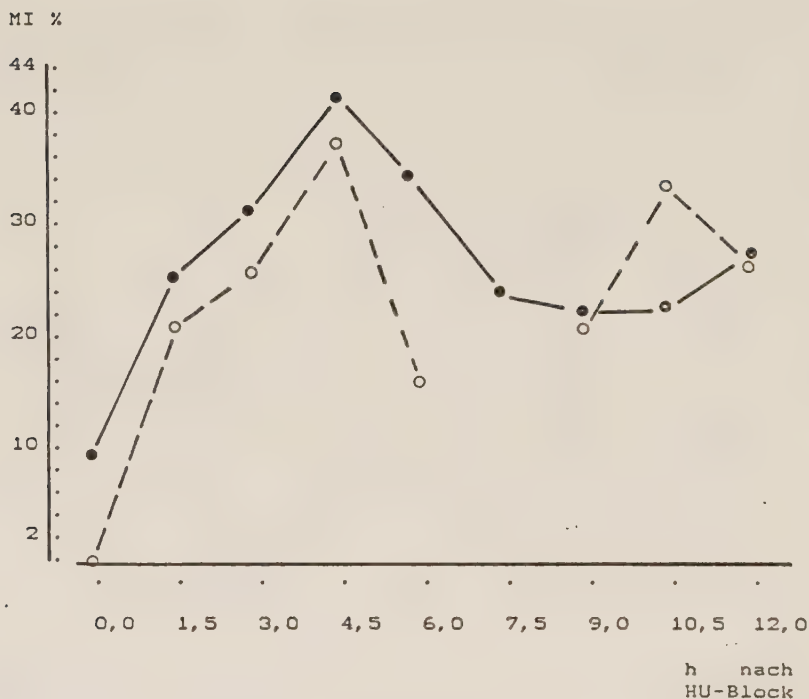


Abb. 25: Mittlerer ^3H -TdR-MI (%) zu verschiedenen Zeitabständen nach dem Ende des HU-Blocks. MI in GGT-foci jeweils mit PB (● — ●) und ohne PB (○ --- ○). 7,5 Stunden nach HU war bei den Tieren ohne PB kein GGT-Bezirk vorhanden (Werte ohne PB-Fütterung aus Galm, 1987).

MI %

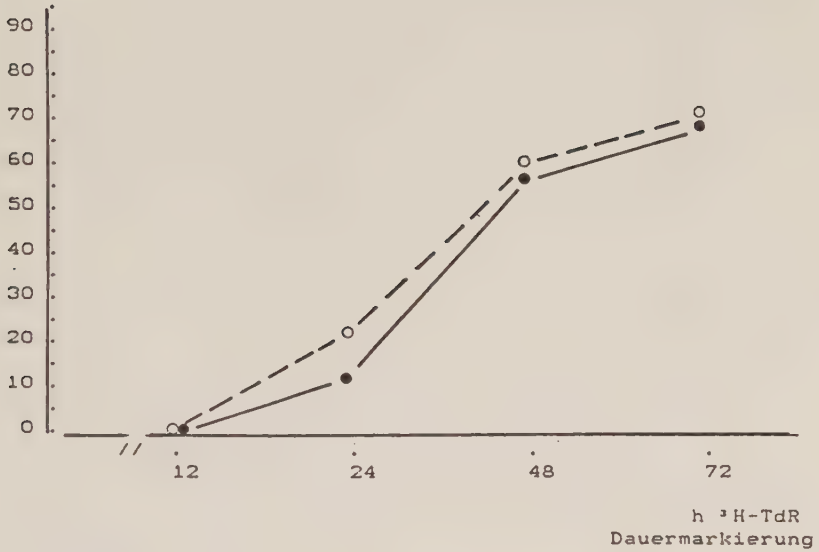


Abb. 26: Mittlerer MI (%) nach verschiedenen Expositionszeiten mit ³H-TdR. MI im Normalgewebe jeweils mit PB (● — ●) und ohne PB (○ --- ○) (Werte ohne PB-Fütterung aus Galm, 1987).

MI %

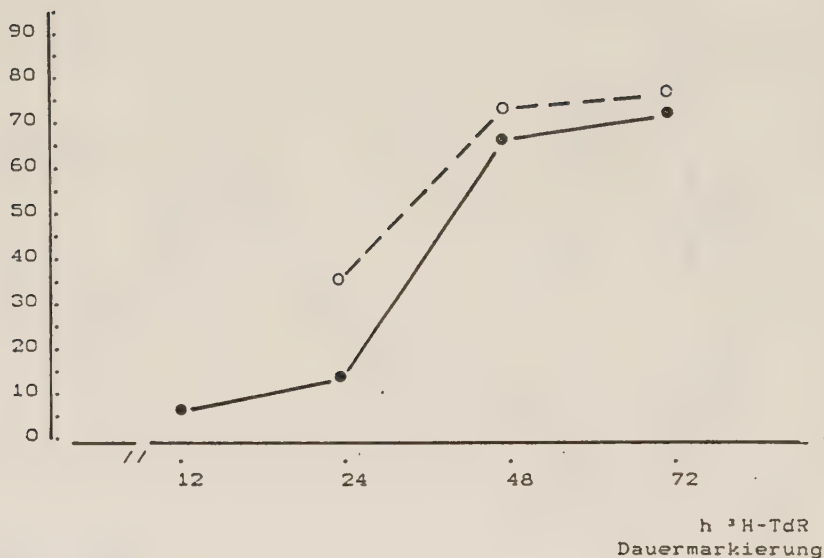


Abb. 27: Mittlerer MI (%) nach verschiedenen Expositionszeiten mit $^3\text{H-TdR}$. MI in GGT* foci jeweils mit PB (● — ●) und ohne PB (○ --- ○). Nach 12 h war bei den Tieren ohne PB kein GGT* Bezirk vorhanden (Werte ohne PB-Fütterung aus Galm, 1987).

Im Normalgewebe liegt der MI nach Absetzen des HU in PB-Tieren höher als in PB-unbehandelten Ratten. Die Proliferationszunahme des MI bis 4,5 Stunden ist annähernd gleich. Zwischen 4,5 und 6,0 Stunden fällt der MI in nicht-promovierter Leber signifikant bis auf 15,0% gegenüber 37,1%. Nach einem Minimum bei 9,0 Stunden mit 15,7% für PB-unbehandelte Tiere erfolgt bis 12,0 Stunden eine langsame Zunahme des MI bis auf 19,4%; signifikante Unterschiede treten zwischen 7,5 und 12,0 Stunden nicht mehr auf.

Der MI in GGT⁺ foci nach einer Promotionsphase mit PB liegt nach dem Absetzen des HU höher als in EAB nicht promovierten Lebergewebes. Auch hier erfolgt ein in etwa gleicher Anstieg des MI bis 4,5 Stunden, er hat hier sein Maximum mit 38,1% in PB-freier Rattenleber. Jenseits 4,5 Stunden erfolgt bei Tieren ohne PB ein starker Abfall, er ist steiler und liegt nach 6,0 Stunden um 18,5% signifikant niedriger als bei PB-exponierten Ratten. 9,0 Stunden nach HU kommt es zu einer zweiten Proliferationssteigerung, bei Tieren ohne PB stärker und nach 10,5 Stunden mit einem Maximum bei 34,0% signifikant höher. Zur Stunde 12,0 konnte kein weiterer signifikanter Unterschied des MI beobachtet werden.

Hepatozyten im Normalgewebe und in den GGT⁺ foci zeigen eine signifikant höhere Grundproliferation nach einer PB-Diät. Der in EAB gegenüber dem Normalgewebe signifikant erhöhte MI in PB-Tieren könnte auf eine selektive Proliferationssteigerung in GGT⁺ foci durch den Promotor PB zurückzuführen sein.

Der erhöhte MI im Normalgewebe und in den GGT⁺ foci phenobarbitalbehandelter Leber, unmittelbar nach dem Absetzen der

HU-Infusion, könnte ein weiterer Hinweis auf eine PB-induzierte Resistenz der Hepatozyten gegenüber HU sein.

In nicht promoviertem Normalgewebe kommt es nach einem Maximum des MI nach 4,5 Stunden zu einem steilen Abfall gegen 6,0 Stunden. Im Lebergewebe bei PB-Tieren kommt es zwischen 4,5 und 6,0 Stunden zu einem weiteren Anstieg des MI, der hier seinen maximalen Wert von 37,1% erreicht; in den GGT⁺ foci und im Normalgewebe der PB-Tiere ist der Abfall des MI verzögert.

Da bis 4,5 Stunden nach HU die Antwort auf eine PH in PB- und Nicht-PB-Tieren für alle Hepatozyten etwa gleich ist, könnte der verlängerte Anstieg des MI im Normalgewebe und der verzögerte Abfall in den foci bei phenobarbitalbehandeltem Lebergewebe Ausdruck einer weniger scharfen Synchronie des S-Kompartiments nach PB sein. Dagegen spricht aber die Erkenntnis, daß PB ohne HU-Exposition zu einer Verbesserung des G₁/S-Transits führt (Rabes, 1976). Infolgedessen müßten sich relativ mehr Hepatozyten des Proliferationspools in der frühen DNA-Synthesephase mit geringer Synthesegeschwindigkeit finden. Damit könnte jedoch der verspätete Peak nicht erklärt werden und ebenso nicht der verzögerte Abfall des MI bei PB-Tieren.

In den GGT⁺ foci liegt der MI nach 10,5 Stunden bei Nicht-PB-Tieren signifikant höher. Man könnte interpretieren, daß der zweite Anstieg des MI in PB-behandeltem Lebergewebe verzögert erfolgt. Unter der Voraussetzung einer S-Phasenverlängerung durch PB könnte dies zur Verzögerung der mitotischen Zellteilung führen. Eine nur partiell synchrone Proliferationswelle aus der perivenösen Zone III (Rabes et al., 1986) würde sich in einem verspätet erhöhtem MI zeigen.

Bei dieser Gegenüberstellung muß darauf hingewiesen werden, daß bei nicht mit PB exponierten Ratten bei gleicher Versuchsdauer wie in vorliegender Arbeit wegen des Fehlens der promovierenden Wirkung, nur relativ wenige GGT⁺ foci entstanden. Entsprechend muß eine größere Streuung der Ergebnisse angenommen werden.

Bei der ³H-TdR-Dauermarkierung konnten im Normalgewebe keine signifikanten Unterschiede zwischen PB- und nicht-PB-behandeltem Gewebe beobachtet werden. Dies könnte so verstanden werden, daß das Normalgewebe der Leber aus einer relativ homogenen Zellpopulation besteht, die unabhängig von weiteren exogenen Faktoren nach für jeden Lobulusabschnitt vorgegebenen Zeitplan auf den Reiz einer PH reagiert.

In GGT⁺ foci waren nach 24 und 48 Stunden Dauermarkierung die MI in PB-Tieren signifikant erniedrigt. Die MI der Dauermarkierung sind Summationswerte. Alle Hepatozyten, die bis zu einem bestimmten Zeitpunkt in die DNA-Synthese eintreten, werden als markiert erfaßt. Man könnte daraus schließen, daß in PB-behandelten EAB nicht alle Hepatozyten auf einen Wachstumsimpuls wie die PH ansprechen. Dies wäre ein Hinweis, daß die GGT⁺ Bezirke aus einer heterogenen Zellgruppe bestehen, die unterschiedlich auf die PH ansprechen (Rabes et al., 1972b).

Der erniedrigte MI könnte auch durch ein Markierungsartefakt hervorgerufen werden. PB könnte, durch Induktion mischfunktioneller Oxydasen (Remmer und Merker, 1963a, b; Greim et al., 1970) einen erhöhten Katabolismus des ³H-TdR bewirken, der es der DNA-Synthese entzieht. Dagegen spricht

die Verwendung einer relativ hohen ^3H -TdR-Dosis pro Zeiteinheit und die relativ niedrige spezifische Aktivität des verwendeten ^3H -TdR (siehe Material und Methoden). Außerdem ist die Aktivität der mischfunktionellen Oxydasen, induziert durch PB, nach einer PH für einen begrenzten Zeitraum verringert. Das Ausmaß ist u.a. abhängig von der Dosis und dem Zeitpunkt der Applikation (Gram et al., 1968; Chiesara et al., 1970; Hilton und Sartorelli, 1970; Glazer und Sartorelli, 1972).

Eine Markierung aller Hepatozyten wurde auch nach 72stündiger ^3H -TdR-Dauerinfusion nicht erreicht. Dies könnte daran liegen, daß während der DNA-Synthese des Organs ein Teil der Leber organspezifische Aufgaben für den Organismus weiterhin aufrecht erhält, die mit einer DNA-Synthese nicht vereinbar sind (Tuczek et al., 1975).

PB, nach einem Carcinogen über längere Zeit gegeben, führt zu einer Vermehrung der EAB (Pitot et al., 1978; Schulte-Hermann et al., 1986). Dies kommt auch in der vorliegenden Arbeit deutlich zum Ausdruck. Unmittelbar nach Absetzen des HU ist die Anzahl der GGT $^+$ foci um das 70fache signifikant erhöht und liegt ebenfalls zu den Zeitpunkten 3,0 und 7,5-12,0 Stunden nach HU in PB-Tieren signifikant über den unbehandelten Tieren. Gegenüber den nichtheptatektomierten Versuchstieren ist die Anzahl der foci nach PB um das 20,3fache erhöht.

Ein Abfall der Anzahl der GGT $^+$ foci während der S-Phase und der anschließende Wiederanstieg ist bei den Tieren ohne PB nur sehr undeutlich ausgeprägt; die Ergebnisse zeigen eine große Streuung.

Zu dem Abfall während der S-Phase aufgrund einer Minderproduktion der GGT könnte noch ein zusätzlicher metabolischer Abbau der GGT nach Enzyminduktion durch PB hinzukommen, der den stärker ausgeprägten Kurvenabfall während der S-Phase bei diesen Tieren erklären könnte. Aber auch hierfür liegen in der Literatur keine Angaben vor.

24 Stunden nach der partiellen Hepatektomie, sofort nach dem Absetzen der HU-Infusion, beträgt die mittlere Anzahl der GGT⁺ foci in PB-Tieren 28 EAB pro cm² Gesamtfläche; in nicht-PB-exponierten Ratten dagegen nur 0,4 EAB pro Gesamtfläche. I.e., daß in diesen Versuchsreihen PB bei teilhepatektomierten Versuchstieren eine Zunahme der numerischen Dichte der GGT⁺ foci um das 70fache bewirkt. In nicht-teilhepatektomierten Tieren führt PB lediglich zu einer numerische Zunahme der GGT⁺ foci pro cm² Gesamtfläche von 3,2 auf 64,8. Dies bedeutet eine Steigerung um das 20,3fache. Als eine Ursache für diese Diskrepanz könnte die partielle Hepatektomie in Frage kommen. Eine signifikante Zunahme GGT⁺ foci nach partieller Hepatektomie, die mindestens für ein Jahr konstant blieb, wurde bei weiblichen Fischer-Ratten (F 344) beschrieben, jedoch nicht bei männlichen und weiblichen Wistar-Ratten (Bone III et al., 1985).

Die eigenen Ergebnisse könnten ein Hinweis für die Induktion der GGT in Hepatozyten auf den Reiz einer PH bei den hier verwendeten männlichen Wistar-Ratten (Wistar/Han) sein. Dies würde die Aussagekraft der GGT für quantitative Analysen in Frage stellen, besonders im Vergleich unterschiedlicher Tierstämme oder Tiere unterschiedlicher Geschlechtszugehörigkeit.

E. Zusammenfassung

Wesentliche Eigenschaft maligner Tumoren ist eine Störung der Reaktion auf übergeordnete homöostatische Kontrollen. Es ist unbekannt, in welchem Stadium der Lebertumorentstehung die Proliferationskontrolle modifiziert wird. Ziel dieser Arbeit war es, in der praeneoplastischen Latenzperiode der Hepatocarcinogenese zu untersuchen, ob sich unter Einfluß des Tumorpromotors Phenobarbital (PB) das proliferative Verhalten praeneoplastischer Leberzellen ändert.

Als Modell wurde die regenerierende, durch Hydroxyharnstoff (HU) teilsynchronisierte Rattenleber verwendet. An diesem System war es möglich, die Proliferation praeneoplastisch veränderter Hepatozyten auf den Wachstumsreiz einer partiellen Hepatektomie (PH) quantitativ zu untersuchen.

Männliche Wistar-Ratten (Wistar/Han) mit einem Anfangsgewicht von 93-110g dienten als Versuchstiere. Sie erhielten 20 Einzelgaben des Carcinogens Diethylnitrosamin (DNA) in einer Dosis von 8mg/kg KG i.p. injiziert und wurden anschließend 91 Tage mit PB (0,05% in der Normaldiät) gefüttert. Tiere der Gruppe A wurden nach 91 Tagen partiell hepatektomiert und von der 14. bis zur 24. Stunde nach der Resektion mit Hydroxyharnstoff infundiert. Nach dem Ende der Zellzyklusblockade wurden die Tiere im Abstand von 1,5 Stunden bis 12,0 Stunden nach HU mit ³H-TdR injiziert, 60 min später wurde die Leber entnommen. Tiere der Versuchsgruppe B wurden 91 Tage nach dem Ende der DNA-Injektion und anschließender PB-Fütterung ebenfalls leberteilreseziert. Unmittelbar danach erhielten sie über eine intraperitoneal

implantierte osmotische Minipumpe für 12, 24, 48 und 72 Stunden eine Dauerinfusion mit ^3H -TdR. Die Leber wurde anschließend untersucht. Tiergruppe C diente als Kontrollgruppe zur Bestimmung der basalen Proliferation an der ruhenden Leber ohne PH und HU-Synchronisation. Nach 91 Tagen PB-Fütterung wurden diese Tiere mit ^3H -TdR pulsmarkiert und 60 min später die Leber entnommen. Durch autoradiographische Auswertung der Leberpräparate wurde nach der Pulsmarkierung der Anteil der Hepatozyten in DNA-Synthese an der Gesamtzellzahl, der ^3H -TdR-Markierungsindex (MI), ermittelt. An Dauermarkierungs-Präparaten wurde für die verschiedenen Zeitspannen der Gesamtanteil der DNA-synthetisierenden Hepatozyten kumulativ bestimmt.

Praeneoplastisch veränderte Bezirke wurden durch enzymhistochemische Färbungen der GGT und der ATPase kenntlich gemacht. In diesen praeneoplastischen Enzymaberrationsbezirken (EAB) und im umliegenden unveränderten Parenchym wurden autoradiographisch die Markierungsindices bestimmt. Die numerische Dichte der EAB wurde unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Flächen der EAB wurden mit Hilfe eines halbautomatischen Planimetriergerätes gemessen und als relativer Flächenanteil am Gesamtparenchym angegeben. Während der Auswertung wurden einzelne und in kleinen Gruppen auftretenden, nicht den praeneoplastischen EAB zuzuordnende GGT $^+$ Hepatozyten notiert.

Hepatozyten im Normalgewebe und in den GGT $^+$ foci weisen bei PB-gefütterten Tieren eine signifikant höhere Grundproliferation auf, als bei nicht-PB-exponierten Ratten (Galm, 1987). Darüber hinaus war die Proliferation in GGT $^+$ foci

gegenüber dem Normalgewebe PB-behandelter Rattenleber signifikant erhöht.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß PB die Grundproliferation sowohl im Normalgewebe als auch in den GGT⁺ Bezirken der Leber erhöht und daß praeneoplastische Hepatozyten der foci durch PB einen Proliferationsvorteil gegenüber dem Normalparenchym erhalten.

Ein unmittelbar nach dem Absetzen der Zellzyklusblockade relativ hoher Markierungsindex in GGT⁺ foci könnte ein Hinweis für eine Resistenz der veränderten Hepatozyten gegenüber Hydroxyharnstoff sein.

Der Markierungsindex erreichte 4,5 Stunden nach dem HU-Block ein Maximum von 42,0%, fiel anschließend ab und stieg nach 12,0 Stunden bis zu einem zweiten Maximum von 27,3% an. Der ähnliche Verlauf des MI in GGT⁺ foci und im Normalgewebe der Leber PB-exponierter Tiere weist darauf hin, daß eine übergeordnete homöostatische Kontrolle der Zellproliferation in diesem Entwicklungsstadium der Praeneoplasie noch weitgehend intakt ist.

Ein verzögerter Abfall des MI in GGT⁺ foci und im Normalgewebe und ein verzögerter Wiederanstieg des MI in Enzymaberrationsbezirken PB-behandelter Tiere könnte, im Gegensatz zu nicht-PB-exponierten Ratten (Galm, 1987), ein Hinweis für eine Verlängerung der S-Phase in GGT⁺ foci und im Normalgewebe durch PB sein.

Die Wachstumsfraktion in GGT⁺ foci nach 24 und 48 Stunden Dauermarkierung ist in PB-Tieren gegenüber nicht-PB-Tieren (Galm, 1987) signifikant erniedrigt. Dies könnte darauf hinweisen, daß die Hepatozyten in GGT⁺ foci nach 91tägiger

PB-Applikation einer heterogenen Zellgruppe angehören, die im unterschiedlichen Ausmaß auf einen Proliferationsreiz reagiert.

PB führt zu einer Erhöhung der Anzahl GGT⁺ Bezirke; nach dem Ende des HU-Blocks ist die Anzahl um das 70fache, in nicht-hepatektomierten Versuchstieren um das 20,3fache gegenüber PB-unbehandelten Tieren erhöht (Galm, 1987). Diese Differenz weist auf eine Induktion der GGT durch eine PH hin, die schon für verschiedene Versuchstierstämme beschrieben wurde, nicht jedoch für die hier verwendeten männlichen Wistar-Ratten. Im Gegensatz hierzu wurde eine Verminderung der Anzahl der GGT⁺ foci während der S-Phase, besonders in der Leber PB-exponierter Tiere beobachtet. Ursächlich könnte eine verringerte GGT-Produktion während der DNA-Synthese in Frage kommen. Dagegen konnte eine veränderte Expression der ATPase während der Zellregeneration nicht festgestellt werden. Eine verminderte GGT-Produktion kam auch in verringerten relativen EAB-Flächen während der DNA-Synthese zum Ausdruck.

Bei der Auswertung fiel das Auftreten einzelner oder in kleinen Gruppen liegender GGT⁺ Hepatozyten auf. Eine Regelmäßigkeit bezüglich ihrer Verteilung oder ihres Proliferationsverhaltens konnte nicht gefunden werden. Dieser Befund wurde bisher für verschiedene Versuchstiere, wie auch weibliche Wistar-Ratten beschrieben, nicht jedoch für die hier verwendeten männlichen Wistar-Ratten.

Das Auftreten dieser unspezifischen GGT⁺ Hepatozyten aufgrund einer möglichen Induktion der GGT durch die PH stellt die Wertigkeit dieses Enzyms für die quantitative Analyse

der Vorgänge während der Carcinogenese in Frage, besonders beim Vergleich unterschiedlicher Tierstämme und von Tieren verschiedenen Geschlechts.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen darauf hin, daß in diesem Entwicklungszustand der Carcinogenese eine Störung der homöostatischen Regulation auf der Ebene der Zellproliferation noch nicht stattfindet. Andererseits kommt es zu einer Dysregulation der Enzymexpression besonders in GGT-Enzymaberrationsbezirken. Auf der Basis dieser Störungen wäre eine Aberration der homöostatischen Regulation in späteren Stadien der Praeneoplasie mit Übergang in die Malignität denkbar.

F. Literaturverzeichnis

Abbott, P.J., and Saffhill, R.: DNA synthesis with methylated poly (dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine. Biochim. Biophys. Acta 562, 51-61 (1979).

Amlacher, E.: Autoradiographie in Histologie und Zytologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1974.

Bannasch, P. und Müller, H.-A.: Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitrosomorpholin auf die Leber von Ratte und Maus. Arzneim.-Forsch. 14, 805-814 (1964).

Bannasch, P.: Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. Cancer Res. 36, 2555-2562 (1976).

Bannasch, P.: Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. Carcinogenesis 7, 689-695 (1986).

Barbason, H., Smoliar, V., Fridman-Manduzio, A., and Betz, E.H.: Effects of the discontinuation of chronic DENA feeding in the development of hepatomas in adult rats. Br. J. Cancer 40, 260 (1979).

Barbason, H., and Betz, E.H.: Liver cell control after discontinuation of DENA feeding in hepatocarcinogenesis. Eur. J. Cancer 17, 149-154 (1981a).

Barbason, H., and Betz, E.H.: Proliferation of preneoplastic lesions after discontinuation of chronic DENA feeding in the development of hepatomas in rat. Br. J. Cancer 44, 561-566 (1981b).

Barbason, H., Rassenfosse, C., and Betz, E.H.: Promotion mechanism of phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinogenesis cell kinetics effect.
Br. J. Cancer 47, 517-525 (1983).

Becker, F.F.: The normal hepatocyte in division: Regeneration of mammalian liver.
In: H. Popper, and F. Schaffner (eds.): Progress in liver diseases, vol. III, pp. 60-76, Grune and Stratton, New York (1970).

Becker, F.F.: Humoral aspects of liver regeneration.
In: J. LoBue, and A.S. Gordon (eds.): Humoral control of growth and differentiation, vol. I, pp. 249-256, Academic Press, New York (1973).

Bentley, P., and Oesch F.: Foreign Compound metabolism in the liver.
In: H. Popper, and F. Schaffner (eds.): Progress in liver diseases, vol. VIII, pp. 157-178, Grune and Stratton, New York, San Francisco, London (1982).

Berenblum, I., and Shubik, P.: The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumor induction in the mouse's skin.
Br. J. Cancer 1, 379-391 (1947).

Berenblum, I., and Shubik, P.: An experimental study of the initiating stage of carcinogenesis, and a reevaluation of the somatic cell mutation theory of cancer.
Br. J. Cancer 3, 109-118 (1949).

Bone, S.N., III, Michalopoulos, G., and Jirtle, R.L.: Ability of partial hepatectomy to induce gamma-glutamyl-trans-peptidase in regenerated and transplanted hepatocytes of Fischer 344 and Wistar-Furth rats.
Cancer Res. 45, 1222-1228 (1985).

Bucher, N.L.R., Swaffield, M.N., and Di Troia, J.F.: The influence of age upon the incorporation of Thymidine-2-C¹⁴ into the DNA of regenerating rat liver. Cancer Res. 24, 509-512 (1964).

Bucher, N.L.R.: Experimental aspects of hepatic regeneration. New Engl. J. Med. 13, 686-696, 738-746 (1967).

Bucher, N.L.R., and Malt, R.A.: Regeneration of liver and kidney. Boston, Little, Brown and Co (1971).

Cairns, J., Robins, P., Sedgwick, B., and Talmud, P.H.: The inducible repair of alkylated DNA. Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 26, 237-244 (1981).

Chiesara, E., Conti, F., and Meldolesi, J.: Influence of partial hepatectomy on the induction of liver microsomal drug-metabolizing enzymes produced by phenobarbital. A biochemical and ultrastructural study. Lab. Invest. 22, 329-338 (1970).

Cohen, S.S., and Barner, H.D.: Studies on unbalanced growth in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 40, 885-893 (1954).

Craddock, V.M., and Frei, J.V.: Induction of liver cell adenomata in the rat by a single treatment with N-methyl-N-nitrosourea given at various times after partial hepatectomy. Br. J. Cancer 30, 503-511 (1974).

Druckrey H., Preussmann R., Ivankovic S. und Schmähel, D.: Organotrope carcinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforsch. 69, 103-201 (1967).

Emmelot, P., and Scherer, E.: The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach. *Biochim. Biophys. Acta* 605, 247-304 (1980).

Epstein, S., Ito, N., Merkow, L., and Farber, E.: Cellular analysis of liver carcinogenesis: the induction of large hyperplastic nodules in the liver with 2-fluorenylacetamide or ethionine and some aspects of their morphology and glycogen metabolism. *Cancer Res.* 27, 1702-1711 (1967).

Farber, E., and Baserga, R.: Differential effects of hydroxyurea on survival of proliferating cells in vivo. *Cancer Res.* 29, 136-139 (1969).

Farber, E.: Biochemical pathology of experimental liver carcinogenesis.
In: G.W. Warwick, H.M. Cameron, and C.A. Linsell (eds.): *Liver Cell Cancer*, pp. 245-279, Amsterdam (1976).

Farber, E.: Experimental liver carcinogenesis: A perspective.
In: H. Remmer, H.M. Bolt, P. Bannasch, and H. Popper (eds.): *Primary Liver Tumors*, pp. 357-375. MTP Press, Lancaster (1978).

Farber, E.: The sequential analysis of liver cancer induction. *Biochim. Biophys. Acta*, 605, 149-166 (1980).

Farber, E.: Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 44, 5463-5474 (1984).

Fiala, S., and Fiala, E.S.: Activation by chemical carcinogens of gamma-glutamyl transpeptidase in rat and mouse liver. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 151-158 (1973).

Fischer, G., Lilienblum, W., Uldrich, D., and Bock, K.W.: Immunohistochemical differentiation of gamma-glutamyltranspeptidase in focal lesions and in zone I of rat liver after treatment with chemical carcinogens. Carcinogenesis 7, 1405-1410 (1986).

Frei, J.V., and Richie, A.C.: Diurnal variations in the susceptibility of mouse epidermis to carcinogen and its relationship to DNA synthesis. J. Natl. Cancer Inst. 32, 1213 (1964).

Friedrich-Frekxa, H., Gössner, W. und Börner, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergabe von Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforsch. 72, 226-239 (1969).

Fridman-Manduzio, A., Gol-Winkler, R., Betz, E.H., and Goutier, R.: Tumor frequency and characteristics after a single dose of dimethylnitrosamine or diethylnitrosamine in partially hepatectomized rats. Z. Krebsforsch. 90, 13-24 (1977).

Friedwald, W.F., and Rous, P.: The initiating and promoting elements in tumor production. An analysis of the effects of tar, benzpyrene and methylcholantrene on rabbit skin. J. Exptl. Med. 80, 101-126 (1944).

Galm, R.: Untersuchungen zur Wachstumsregulation bei der Lebercarcinogenese. Als Dissertation aus dem Pathologischen Institut der Universität München, vorgelegt 1987.

Glazer, R.I., and Sartorelli, A.S.: The effect of phenobarbital on the synthesis of nascent protein on free and membrane-bound polyribosomes of normal and regenerating liver. Molec. Pharmacol. 8, 701-710 (1972).

Gössner, W. und Friedrich-Freksa, H.: Histochemische Untersuchungen über die Glukose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine.
Z. Naturforsch. 19b, 862-863 (1964).

Goth, R., and Rajewsky, M.F.: Persistence of O⁶-Ethylguanine in rat brain DNA: Correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 639-643 (1974).

Gram, T.E., Guarino, A.M., Greene, F.E., Gigon, P.L., and Gillette, J.R.: Effect of partial hepatectomy on the responsiveness of microsomal enzymes and cytochrome P-450 to the phenobarbital or 3-methylcholantrene.
Biochem. Pharmacol. 17, 1769-1778 (1968).

Greim, H., Schenkmann, J.B., Klotzbücher, M., and Remmer, H.: The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b₅ and cytochrome P-450 hemes in the rat.
Biochim. Biophys. Acta 201, 20-25 (1970).

Grisham, J.W.: Effects of drugs on hepatic cell proliferation.
In: A.M. Zimmermann, G.M. Padilla, and I.L. Cameron (eds.): Drugs and cell cycle, pp. 95-136, Academic Press, New York (1973).

Hartmann, A.: Zellproliferation und Cancerogenese: Untersuchungen an der Rattenleber nach zweimaliger Hepatektomie und Zellsynchronisation durch Hydroxyharnstoff.
Als Dissertation aus dem Pathologischen Institut der Universität München, vorgelegt 1981.

Hartmann, A. und Rabes, H.M.: Die Entstehung praeneoplastischer Läsionen in der Rattenleber nach zweimaliger Carcinogenexposition in spezifischen Phasen des Zellzyklus.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 66, 503 (1982).

Hendrich, S., Glauert, H.P., and Pitot, H.C.: The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital. Carcinogenesis 7, 2041-2045 (1986).

Higgins, G.M., and Anderson, R.M.: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Path. 12, 186-202 (1931).

Hilton, J., and Sartorelli, A.C.: Induction by phenobarbital of microsomal mixed oxidase enzymes in regenerating rat liver. J. Biol. Chem. 245, 4187-4192 (1970).

Iseler, G.: Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung. Als Dissertation aus dem Pathologischen Institut der Universität München, vorgelegt 1977.

Kitagawa, T., and Sugano, H.: Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme-altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene or diethylnitrosamine. Gann 69, 679-687 (1978).

Kitagawa, T., Pitot, H.C., Miller, E.C., and Miller, J.A.: Promotion by dietary phenobarbital of hepatocarcinogenesis by 2-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene in the rat. Cancer Res. 39, 112-115 (1979).

Kleihues, P., and Margison, G.P.: Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea: possible role of excision repair of O⁶-methylguanine from DNA. J. Natl. Cancer Inst. 53, 1839-1841 (1974).

Koen, H., Pugh, T.D., Nychka, D., and Goldfarb, S.: Presence of α -fetoprotein-positive cells in hepatocellular foci and microcarcinomas induced by single injections of diethylnitrosamine in infant mice. *Cancer Res.* 43, 702-708 (1983).

Krakoff, I.H., Brown, N.C., and Reichard, P.: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* 28, 1559-1565 (1968).

Leduc, E.H.: Regeneration of the liver. In: C. Rouiller (ed.): *The liver: morphology, biochemistry, physiology*, vol. 2, pp. 63-89, Academic Press Inc., New York (1964).

Lennartz, K.J.: Grundlagen, Technik und Anwendungsbereich der Autoradiographie. *MTA* 4, 153-163 (1978).

Loveless, A.: Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 223, 206-207 (1969).

Magee, P.N., and Barnes, J.M.: The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer* 10, 114-122 (1956).

Magee, P.N., and Farber, E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* 83, 114-124 (1962).

Magee, P.N., and Lee, K.Y.: Cellular injury and carcinogenesis. Alkylation of ribonucleic acid of rat liver by diethylnitrosamine and n-buthylmethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* 91, 35-42 (1964).

Magee, P.N., Pegg, A.E., and Swann, P.F.: Molekular mechanisms of chemical carcinogenesis.
In: Handb. Allg. Path., Band 6, Geschwülste II/6, pp. 329-419, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975).

Mehta, J.R., and Ludlum, D.B.: Synthesis and properties of O⁶-methyldeoxyguanylic acid and its copolymers with deoxycytidylic acid.
Biochim. Biophys. Acta 521, 770-778 (1978).

Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals: an overview.
G.H.A. Clowes memorial lecture.
Cancer Res. 30, 559-576 (1970).

Miller, E.C., and Miller, J.A.: The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations.
In: A. Hollaender (ed.): Chemical mutagens-principles and methods for their detection, vol. 1, pp. 83-118, Plenum Press, New York (1971).

Miller, E.C., and Miller, J.A.: Biochemical mechanisms of chemical carcinogenesis.
In: H. Busch (ed.): The molecular biology of cancer, pp. 377-402, Academic Press, New York and London (1974).

Miller, E.C.: Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address.
Cancer Res. 38, 1479-1496 (1978).

Müller, L., and Rabes, H.M.: Cell cycle dependent initiation of ATPase-deficient preneoplastic cell populations in regenerating rat liver.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 105, A 22 (1983).

Oehlert, W., Hämmerling, W. und Büchner, F.: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonukleinsäure-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie.
Beitr. path. Anat. 126, 91-112 (1962).

Okita, K., Gruenstein, M., Klaiber, M., and Farber, E.: Localization of α -fetoprotein by immunfluorescence in hyperplastic nodules during hepatocarcinogenesis by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res. 34, 2758-2763 (1974).

Olsson, M., and Lindahl, T.: Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue. J. Biol. Chem. 255, 10569-10571 (1980).

Pegg, A.E., Wiest, L., Foote, R.S., Mitra, S., and Perry, W.: Purification and properties of O⁶-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver. J. Biol. Chem. 258, 2327-2333 (1983).

Peraino, C., Fry, R.J.M., and Staffeldt, E.: Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res. 31, 1506-1512 (1971).

Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E., and Kisielleski, W.E.: Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. Cancer Res. 33, 2701-2705 (1973).

Pfeiffer, S.E., and Tolmach, L.J.: Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxyurea. Cancer Res. 27, 124-129 (1967).

Pitot, H.C., Barsness, L., Goldsworthy, T., and Kitagawa, T.: Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. Nature 271, 456-458 (1978).

Pitot, H.C., and Sirica, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. Biochim. Biophys. Acta 605, 191-215 (1980).

Plagemann, P.G.E., and Erbe, J.: Intracellular conversions of deoxyribonucleosides by Novikoff rat hepatoma cells and effects of hydroxyurea.

J. Cellular Physiol. 83, 321-336 (1974).

Preussmann, R.: Hepatocarcinogens as potential risk for human liver cancer.

In: H. Remmer, H.M. Bolt, P. Bannasch, and H. Popper (eds.): Primary liver tumors. MTP Press 11-29, Lancaster (1978).

Pugh, T.D., and Goldfarb, S.: Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital.

Cancer Res. 38, 4450-4457 (1978).

Rabes, H.M.: Beeinflussung der Proliferationsaktivität normaler und maligner Gewebe durch Hypophysektomie.

Z. Krebsforsch. 72, 176-184 (1969).

Rabes, H.M., and Brändle, H.: Synthesis of RNA, protein, and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy.

Cancer Res. 29, 817-822 (1969).

Rabes, H.M., Hartenstein, R., and Scholze, P.: Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis.

Experientia 26, 1356-1359 (1970).

Rabes, H.M. und Tuczec, H.V.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie.

Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6, 302-312 (1970).

Rabes, H.M., Wirsching, R. und Tuczec, H.V.: Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie.

Naturwissenschaften 59, 221-222 (1972a).

Rabes, H.M., Scholze, P., and Jantsch, B.: Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 32, 2577-2586 (1972b).

Rabes, H.M., Iseler, G. und Tuczek, H.V.: Induzierte Synchronie von Zellzyklusphasen in der regenerierenden Rattenleber. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 59, 459 (1975).

Rabes, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. In: H. Popper and F. Schaffner (eds.): *Progress in liver diseases*, vol. V, pp. 83-99, Grune & Stratton Inc., New York, San Francisco, London (1976).

Rabes, H.M., Wirsching, R., Tuczek, H.V., and Iseler, G.: Analyses of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet.* 9, 517-532 (1976).

Rabes, H.M., Iseler, G., Czichos, S., and Tuczek, H.V.: Synchronization of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea. *Cancer Res.* 37, 1105-1111 (1977).

Rabes, H.M.: Proliferative Vorgänge während der Frühstadien der malignen Transformation. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 63, 18-39 (1979).

Rabes, H.M., and Szymkowiak, R.: Cell kinetics of hepatocytes during the preneoplastic period of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Cancer Res.* 39, 1298-1304 (1979).

Rabes, H.M., Kerler, R., Wilhelm, R., Rode, G., and Riess, H.: Alkylation of DNA and RNA by [¹⁴C]dimethylnitrosamine in hydroxyurea-synchronized regenerating rat liver. *Cancer Res.* 39, 4228-4236 (1979).

Rabes, H.M., Bücher, Th., Hartmann, A., Linke, I., and Dünwald, M.: Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver. *Cancer Res.* 42, 3220-3227 (1982a).

Rabes, H.M., Wilhelm, R., Kerler, R., Rode, G.: Dose- and cell cycle-dependent O⁶-methylguanine elimination from DNA in regenerating rat liver after ¹⁴C-dimethylnitrosamine injektion. *Cancer Res.* 42, 3814-3821 (1982b).

Rabes, H.M., Kerler, R., Schuster, C., Rode, G., Legner, M., Müller, L., and Bücher, T.: Cell proliferation and DNA repair in the liver during early stages of chemical carcinogenesis. In: G. Weber (ed.): *Advances in enzyme regulation*, vol. 23, pp. 241-262, Pergamon Press, Oxford, New York (1985).

Rabes, H.M., Müller, L., Hartmann, A., Kerler, R., and Schuster, C.: Cell cycle-dependent initiation of adenosine triphosphatase-deficient populations in adult rat liver by a single dose of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res.* 46, 645-650 (1986).

Rabes, H.M.: DNA adducts and cell cycle. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 112, 189-195 (1986).

Rajewsky, M.F.: Synchronisation in vivo. Kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea. *Exptl. Cell Res.* 60, 269-276 (1970).

Rajewsky, M.F., Hülser, D.F. und Fabricius, E.: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen. *Z. Krebsforsch.* 76, 266-292 (1971).

Remmer, H. und Merker, H.J.: Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Reticulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital (Luminal).
Klin. Wschr. 41, 276-283 (1963a).

Remmer, H., and Merker, H.J.: Drug-induced changes in the liver endoplasmatic reticulum associated with drug-metabolizing enzymes.
Science 142, 1657-1658 (1963b).

Rink, S.: Untersuchungen zur carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin in der G₁- und S-Phase des Leberzellzyklus.
Als Dissertation aus dem Pathologischen Institut der Universität München, vorgelegt 1985.

Rous, P., and Kidd, J.G.: Conditional neoplasms and sub-threshold neoplastic states: A study of the tar tumors of rabbits.
J. Exp. Med. 73, 365-390 (1941).

Russell, J.J., Staffeldt, E.F., Wright, B.J., Prapuolenis, A., Carnes, B.A., and Peraino, C.: Effects of rat strain, diet composition, and phenobarbital on hepatic gamma-glutamyl transpeptidase histochemistry and on the induction of altered hepatocyte foci and hepatic tumors by diethylnitrosamine.
Cancer Res. 47, 1130-1134 (1987).

Rutenburg, A.M., Kim, H., Fischbein, J.W., Hanker, J.S., Wasserkrug, H.L., and Seligman, A.M.: Histochemical and ultrastructural demonstration of gamma-glutamyl transpeptidase activity.
J. Histochem. Cytochem. 17, 517-526 (1969).

Sachs, L.: Statistische Auswertemethoden, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1969).

Scherer, E., and Emmelot, P.: Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepato-carcinogenesis.
Cancer Res. 36, 2544-2554 (1976).

Schmährl, D., Preussmann, R. und Hamperl, H.: Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten.
Naturwissenschaften 47, 89 (1960).

Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J., and Timmermann-Trosiener, I.: Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin.
Cancer Res. 41, 2556-2562 (1981).

Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., and Schuppler, J.: Promotion of spontaneous preneoplastic cells in rat liver as a possible explanation of tumor production by nonmutagenic compounds.
Cancer Res. 43, 839-844 (1983a).

Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., and Schuppler, J.: Facilitated expression of adaptive responses to phenobarbital in putative pre-stages of liver cancer.
Carcinogenesis 7, 1651-1655 (1986).

Schultze, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nuclein-säure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In: Handb. Allg. Path., Band 2/5, pp. 466-670, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968).

Schuster, C., Rode, G., and Rabes, H.M.: O⁶-methylguanine-repair of methylated DNA in vitro: cell cycle-dependence of rat liver methyltransferase activity.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 110, 98-102 (1985).

Steel, G.G.: Growth kinetics of tumors.
Clarendon Press, Oxford (1977).

Stöcker, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 53-74 (1966).

Swann, P.F., and Magee, P.N.: Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethylsulphate, and methylmethanesulphonate.
Biochem. J. 110, 39-47 (1968).

Swenberg, J.A., Bedell, M.A., Billings, K.C., Umbenhauer, D.R., and Pegg, A.E.: Cell-specific differences in O⁶-alkyl-guanine DNA repair activity during continuous exposure to carcinogen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5499-5502 (1982).

Thomas, C.: Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.
Z. Krebsforsch. 64, 224-233 (1961).

Tuczek, H.V., Skoruppa, W. und Rabes, H.M.: Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen Proliferations- und Funktionsstoffwechsel in der regenerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobarbital.
Virchows Arch. Abt. B Cell Path. 17, 347-361 (1975).

Wachstein, M., and Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi.
Am. J. Clin. Pathol. 27, 13-23 (1957).

Walters, R.A., Tobey, R.A., and Ratliff, R.L.: Cell-cycle-dependent variations of deoxyribonucleoside triphosphate pools in chinese hamster cells.
Biochim. Biophys. Acta 319, 336-347 (1973).

Weisburger, J.H., Madison, R.M., Ward, J.M., Viguera, C., and Weisburger, E.K.: Modification of diethylnitrosamine liver carcinogenesis with phenobarbital but not with immunosuppression.
J. Natl. Cancer Inst. 54, 1185-1188 (1975).

Williams, G.M., and Watanabe, K.: Enhancement of rat hepatocellular-altered foci by the liver tumor promotor phenobarbital: Evidence that foci are precursors of neoplasms and that the promotor acts on carcinogen-induced lesions.
J. Natl. Cancer Inst. 61, 113-121 (1978).

Wogan, G.N.: The induction of liver cell cancer by chemicals.
In: H.M. Cameron, D.A. Linsell, and G.P. Warwick (eds.): Liver cell cancer, pp. 121-152, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford (1976).

Young, C.W., and Hodas, S.: Hydroxyurea: inhibitory effect on DNA metabolism.
Science 146, 1172-1174 (1964).

Young, C.W., Schochetman, G., and Karnofsky, D.A.: Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis: studies in intact cells.
Cancer Res. 27, 526-534 (1967).

Lebenslauf

Als Sohn des Internisten Dr. med. Heinz Wagner und seiner Ehefrau Irene, geb. Kohlndorfer, wurde ich am 27. Mai 1958 in München geboren.

Von 1965 bis 1970 besuchte ich die Volksschule in Miesbach. Anschließend wechselte ich auf das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium, wo ich das Abitur im Jahre 1980 absolvierte.

Nach dem Beginn meines Medizinstudiums im Wintersemester 1980/81 an der LMU-München, konnte ich im September 1982 meine Ärztliche Vorprüfung ablegen.

Nach dem Bestehen des ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung im September 1983 und des zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung im September 1985 arbeitete ich im

1. Tertial meines Praktischen Jahres in der Staatl. Orthopädischen Klinik München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Rosemeyer, im
2. Tertial im Städt. Krankenhaus München-Neuperlach in der ersten Med. Klinik unter der Leitung von Prof. Dr. med. Ottenjann und im
3. Tertial in der Chirurgischen Klinik am Städt. Krankenhaus Rosenheim unter der Leitung von Prof. Dr. med. Hofmann.

Am 13. November 1986 erhielt ich die Approbation als Arzt

Vom 1. Januar 1987 bis zum 30. Juni 1987 arbeitete ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Anatomischen Institut der Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. U. Welsch. Seit 1. August 1987 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter tätig am Pathologischen Institut der Universität München in der Abteilung von Prof. Dr. med. H.M. Rabes.

